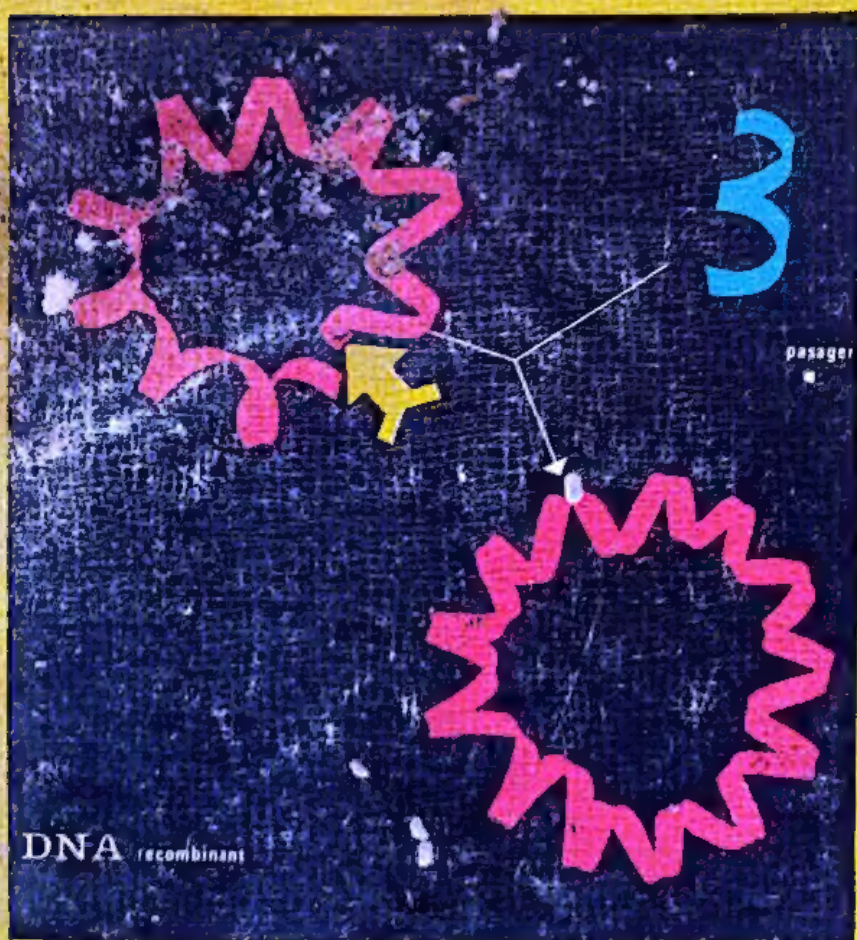


Liviu Popa · Rodica Repanovici

# TEHNOLOGIA DNA RECOMBINANT

(INGINERIE GENETICĂ)





LIVIU M. POPA

RODICA REPANOVICI

# TEHNOLOGIA DNA RECOMBINANT

(inginerie genetică)

*prof. I. Păduraru*



Editura științifică și enciclopedică

București, 1982

## Prefață

În urmă cu trei decenii nimeni nu și-ar fi închipuit că oamenii de știință vor cunoaște structura genelor și modul lor de a se exprima în diferite sisteme celulare, dar în nici un caz că vor fi în stare să proiecteze și să construiască gene. Contrar acestor păreri, într-o perioadă relativ scurtă de timp, s-a demonstrat fără tăgadă că moleculele de acid deoxiribonucleic și acid ribonucleic atât ale organismelor inferioare și superioare, cât și ale virusurilor sînt astfel organizate încît ele conțin în mod codificat informația genetică pentru sinteza proteinelor celulare și, respectiv virale; mai mult chiar, s-au descifrat în multe cazuri mecanismele intime care stau la baza complicatelor reacții prin care se elaborează o anumită proteină în organism, fenomene reproduse curînd în laborator. S-a realizat, de fapt, o adevărată revoluție în biologie, care fără îndoială a schimbat radical imaginea noastră despre procesele fundamentale biologice, progresele realizate fiind de-a dreptul fantastice. Pentru justificare, este suficient să ne referim chiar numai la posibilitatea pe care o avem azi de a oferi unei instalații proiectul sintezei unei gene prin operații automatizate, cu realizarea ei în aproximativ o săptămînă.

Ne găsim deci în plină eră a adevăratei „inginerii genice” iar începutul ei poate fi confundat cu momentul apariției, în anul 1973, a tehnologiei DNA recombinant, tehnologie prin care s-a construit în laborator prima moleculă de DNA activă biologic, în care elementele genetice erau asamblate după dorința omului.

Cartea valoroșilor mei colaboratori din Institutul de virusologie „Ștefan S. Nicolau”, dr. Liviu M. Popa și dr. Rodica Repanovici, prima de acest fel în literatura noastră științifică și după cunoștințele mele și în literatura științifică internațională (mai ales că ea a fost elaborată în cea mai mare parte în anul 1979), tratează cu competență tocmai bazele moleculare ale tehnologiei DNA recombinant.

Ea a fost astfel alcătuită încît să fie utilă atât pentru lămurirea unor aspecte teoretice, dar mai ales pentru a servi ca instrument practic de lucru în abordarea unor numeroase aspecte ale problemei.

*Volumul, ce am cinstea să-l prefătez, se adresează unui public larg format din specialiști în biologie, medicină, chimie, agricultură, fiind utilă — sînt convins — și studenților din diferite facultăți cu profil biologic sau tehnic.*

*Îmi exprim speranța că această carte va da un imbold cercetărilor de inginerie genetică în țara noastră și va contribui la introducerea tehnologiei DNA recombinant în cît mai multe laboratoare și chiar în industrie, în scopul dezvoltării pe plan științific și economic a societății noastre care a plasat și plasează știința la loc de frunte.*

prof. dr. doc. N. CAJAL



## Tabla de materii

Glosar .....	11
Introducere .....	15
<b>I. Relația acizi nucleici-proteine (Generalități) .....</b>	<b>19</b>
I.1. „O genă — un polipeptid“ .....	21
I.2. Particularități întâlnite la eucariote .....	21
I.3. O genă generează mai multe proteine? .....	25
I.4. Mecanisme de reglare a sintezei proteinelor .....	27
I.4.1. Reglarea sintezei proteinelor la procariote .....	28
I.4.2. Cîteva date privind transcrierea informației genetice.....	29
I.4.3. Semnificația unor secvențe de nucleotide din DNA .....	30
<i>Bibliografie</i> .....	33
<b>II. Tehnologia DNA recombinant .....</b>	<b>35</b>
II.1. Schema generală a tehnologiei DNA recombinant .....	36
II.1.1. Vehicul sau vector .....	36
II.1.2. Pasager .....	36
II.1.3. Deschiderea vehiculului .....	37
II.1.4. Formarea de capete coezive la vehicul sau/și pasager .....	37
II.1.5. Legarea pasagerului de vehicul .....	38
II.1.6. Poziția pasagerului în vehicul .....	39
II.1.7. Introducerea și exprimarea DNA recombinant în celule .....	39
II.1.8. Clonarea DNA recombinant .....	41
II.1.9. Identificarea chimică a DNA recombinant .....	41
II.1.10. Identificarea produsului sintetizat de DNA recombinant .....	42
<i>Bibliografie</i> .....	44
<b>III. Fenomenul de restricție și modificare .....</b>	<b>45</b>
III.1. Caracteristicile generale ale sistemului de restricție și modificare .....	48
III.2. Rolul biologic major al restricției și modificării .....	49
III.3. Enzime de restricție .....	51
III.3.1. Sisteme R-M de tip II .....	53
III.3.2. Sisteme R-M de tip I .....	70
III.3.3. Sisteme R-M de tip III .....	78
<i>Bibliografie</i> .....	78



IV. DNA-ligazele .....	81
IV.1. Mecanismul de acțiune .....	82
IV.1.1. Izolarea produsilor intermediari .....	84
IV.1.2. Desfășurarea reacției inverse .....	87
IV.1.3. Analiza cineticii stării staționare .....	88
IV.2. Specificitatea de substrat a DNA-ligazelor .....	91
IV.3. Proprietățile fizico-chimice ale DNA-ligazelor .....	95
IV.3.1. Masa moleculară .....	95
IV.3.2. Compoziția în aminoacizi și proprietățile spectrale .....	95
IV.3.3. Cofactori și ioni .....	96
IV.3.4. pH optim și stabilitate .....	97
IV.3.5. Temperatura optimă .....	97
IV.4. Izolarea și purificarea DNA-ligazelor .....	98
IV.5. Testarea activității DNA-ligazice .....	100
IV.5.1. Conversia DNA liniar la forma CCI .....	102
IV.5.2. Conversia DNA denaturat la forme renaturabile .....	104
IV.5.3. Conversia capetelor 5'— <sup>32</sup> P-fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați .....	105
IV.5.4. Rolul in vivo al DNA-ligazelor .....	107
Bibliografie .....	109
V. Vehicule (vectori) .....	112
V.1. Elemente extracromozomale. Plasmide bacteriene .....	114
V.1.1. Clasificarea plasmidelor .....	114
V.1.2. Compoziția fizică a plasmidelor .....	116
V.1.3. Masele moleculare ale DNA plasmidic .....	117
V.1.4. Conformările moleculare ale DNA plasmidic .....	118
V.1.5. Calculul coeficienților de sedimentare ai diferitelor conformații de DNA ..	121
V.1.6. Replicarea DNA plasmidic .....	122
V.1.7. Mobilizarea (transferul) plasmidelor curent folosite în tehnologia DNA recombinant .....	128
V.1.8. Separarea DNA plasmidic de cel cromozomal .....	130
V.2. Construirea de vehicule derivate din plasmida Col E <sub>1</sub> .....	135
V.3. Descrierea unor vehicule .....	135
V.3.1. Plasmida pBR322 .....	135
V.3.2. Bacteriofagul λ .....	138
V.3.3. Virusul tumoral SV40 .....	146
Bibliografie .....	157
VI. Pasageri (gene) .....	160
VI.1. Izolarea pasagerilor cu enzime specifice .....	161
VI.1.1. Izolarea cu enzime de restricție .....	161
VI.1.2. Alte metode enzimatic .....	162
VI.2. Sinteza enzimatică a pasagerilor .....	162
VI.2.1. Transferul de informație de la RNA la DNA .....	162
VI.2.2. Unele proprietăți generale ale virusurilor tumorale RNA .....	163
VI.2.3. Descoperirea DNA polimerazei RNA dependentă (reverstranscriptază) ..	164
VI.2.4. Utilizarea reverstranscriptazei pentru sinteza pasagerilor (genelor) ..	172
VI.3. Sinteza chimică a pasagerilor (genelor) .....	175
VI.3.1. Metoda I-a sau metoda fosfodiesterilor a lui Khorana și colab. ....	177
VI.3.2. Metoda a II-a sau metoda fosfortriesterică a lui Itakura și colab. ....	186
VI.4. Pregătirea unor pasageri pentru inserția în vehicul .....	193
VI.5. Principii generale de exprimare a genelor-pasager .....	195
VI.5.1. Exprimarea genelor eucariote (pasager) în bacterii .....	195
VI.5.2. Exprimarea genelor procariote (pasager) în celulele mamiferelor .....	197
Bibliografie .....	200



VII. Proprietățile celulelor-gazdă în care se replică DNA recombinant .....	203
VII.1 <i>Escherichia coli</i> .....	203
VII.1.1. Factorii de virulență .....	204
VII.1.2. <i>E. coli</i> K12 .....	204
VII.2. <i>Bacillus subtilis</i> .....	208
Bibliografie .....	209
VIII. Metode de identificare a DNA recombinant .....	210
VIII.1. Excizia segmentului de DNA introdus în DNA recombinant .....	210
VIII.2. Identificarea directă a DNA recombinant prin testul de hibridizare .....	212
VIII.3. Identificarea chimică a pasagerului .....	213
VIII.3.1. Determinarea secvențelor bazelor sale .....	213
Bibliografie .....	219
IX. Realizări .....	220
IX.1. Construirea DNA recombinant conținând gena somatostatinei .....	221
IX.1.1. Planul general al construirii DNA recombinant .....	221
IX.1.2. Identificarea somatostatinei în celulele bacteriene .....	226
IX.2. Construirea DNA recombinant conținând gena insulinei .....	226
IX.2.1. Aspecte structurale ale genei insulinei de șobolan .....	227
IX.3. DNA recombinant conținând gene ale virusului hepatitei B (VHB) .....	232
IX.3.1. Câteva date despre virusul hepatitei B .....	233
IX.3.2. Structura virusului hepatitei B .....	233
IX.3.3. Structura genomului virusului hepatitei B .....	234
IX.3.4. DNA recombinant conținând gena pentru antigenele virusului hepatitei B .....	235
IX.4. DNA recombinant conținând gena hemaglutininei virusului gripal .....	236
IX.4.1. Structura virusurilor gripale .....	237
IX.4.2. Cartarea genei hemaglutininei .....	238
IX.4.3. Structura hemaglutininei .....	239
IX.4.4. Sinteza genei hemaglutininei .....	240
IX.4.5. Obținerea de DNA recombinant conținând gena hemaglutininei .....	241
IX.5. DNA recombinant conținând gena interferonului .....	244
IX.5.1. Generalități. Definiție .....	244
IX.5.2. Clasificarea interferonilor umani (Hu-IFN) .....	244
IX.5.3. Unele proprietăți moleculare ale interferonilor .....	245
IX.5.4. Modul de acțiune a interferonilor (efectul antiviral) .....	246
IX.5.5. Metode convenționale de producere a interferonului .....	247
IX.5.6. Purificarea interferonului .....	248
IX.5.7. Structura primară a unor interferoni .....	249
IX.5.8. Producerea interferonului prin tehnologia DNA recombinant .....	250
IX.6. Construirea de DNA recombinant conținând gena ovalbuminei .....	254
IX.6.1. Gena ovalbuminei .....	255
IX.6.2. mRNA pentru ovalbumină .....	260
IX.6.3. Etapele construirii DNA recombinant pentru ovalbumină .....	260
IX.7. DNA recombinant obținut din operatorul lac și plasmida pMB9 .....	266
IX.7.1. Sinteza chimică a operatorului lac .....	266
IX.8. Obținerea DNA recombinant prin experiment de tip shotgun .....	268
Bibliografie .....	269
X. Perspective .....	273
X.1. Perspective în medicină și în industria farmaceutică .....	273
X.1.1. Diagnosticul prenatal .....	274
X.1.2. Prevenirea și vindecarea unor maladii ereditare .....	274
X.1.3. Tratamentul cancerului .....	277



X.2. Perspective în domeniul agro-alimentar .....	278
X.2.1. <i>Fixarea biologică a azotului atmosferic</i> .....	280
X.2.2. <i>Posibilități de valorificare a fixării biologice a azotului</i> .....	283
X.2.3. <i>Alte perspective</i> .....	284
X.3. În domeniul industrial biotehnologia va înlocui petrochimia? .....	285
X.3.1. <i>Industria fermentativă și problema energiei</i> .....	285
X.3.2. <i>Industria alimentară</i> .....	286
XI. Biohazardul și măsurile de protecție în tehnologia DNA recombinant .....	288
XI.1. Măsuri generale de protecție .....	290
XI.2. Protecția biologică .....	291
XI.2.1. <i>Diferitele nivele de protecție biologică</i> .....	291
XI.3. Protecția fizică .....	292
Bibliografie .....	295
Apendix. Principalele metode utilizate pentru construirea moleculelor de DNA recombinant .....	297
Bibliografie .....	312
Molecular bases of recombinant DNA technology (presentation) .....	313



## Glosarul

termenilor și prescurtărilor principale din text

**A**, acid adenozinmonofosforic (în cazul structurii RNA) sau acid deoxiadenozinmonofosforic (în cazul structurii DNA).

**Amber**, mutație care determină terminarea prematură a sintezei unui polipeptid. Este condiționată de apariția, în urma mutației, a codonului UAG, care constituie semnal de terminare.

### Aminoacizi:

Ala — alanină	Leu — leucină
Arg — arginină	Lys — lizină
Asn — asparagină	Met — metionină
Asp — acid aspartic	Phe — fenilalanină
Cys — cisteină	Pro — prolină
Glu — acid glutamic	Ser — serină
Gln — glutamină	Thr — treonină
Gly — glicină	Trp — triptofan
His — histidină	Tyr — tirozină
Ileu — izoleucină	Val — valină

**Amplificare**, tratamentul culturii bacteriene cu cloramfenicol, pentru a mări proporția de DNA plasmidic în raport cu aceea a DNA cromozomal.

**Antiparalele**, două catene de DNA interacționate prin legături de hidrogen, una dintre catene avînd un sens, iar a doua — sens contrar.

**Antisens**, catenă de DNA care are aceeași secvență ca și mRNA (vezi mai departe).

**AUG**, codonul de inițiere din mRNA, responsabil de codificarea primului aminoacid dintr-o proteină (metionină).

**ATG**, codonul de inițiere din DNA; codifică primul codon din mRNA.

**C**, acid citidinmonofosforic (în cazul structurii RNA) sau acid deoxicitidinmonofosforic (în cazul structurii DNA).

**Cap**, prescurtarea structurii specifice a capătului 5' al majorității mRNA din celulele eucariote; începe cu 7' — metilguanozin-pppX, în care X este primul nucleotid codificat din DNA. Acest nucleotid este adăugat posttranscripțional lângă secvența TATA (*v. cutia Hogness*).

**Capăt coeziv**, capăt monocatenar de DNA, format dintr-un număr variabil de nucleotide, aparținînd unei molecule bicatenare de DNA complementară cu al doilea capăt monocatenar al aceleiași molecule sau al unei alte molecule de DNA.

**Capăt lipicios** (sticky end), capăt coeziv.

**cdNA**, moleculă de acid deoxiribonucleic, complementară unui mRNA.

**Clonă**, grup de celule sau organisme cu structură ereditară identică și care s-au dovedit a proveni dintr-un singur parental. În cazul DNA recombinant, o clonă repre-



zintă colonia de celule generate de captarea unei singure molecule de DNA recombinant.

**Codon**, grup de trei nucleotide care codifică un aminoacid.

**Cutie Hogness (cutie TATA)**, secvențe de nucleotide specifice regiunii promotorului unei gene eucariote.

**Cutie Pribnow**, secvența TATAATG de nucleotide specifice regiunii promotorului unei gene procariote.

**Denaturarea — renaturarea DNA**, proces în cursul căruia legăturile de hidrogen dintre baze se desfac, iar DNA bicatenar devine monocatenar. DNA bicatenar denaturat prin căldură, supus unei răcirii lente, se renaturează în sensul că din moleculele monocatenare se refac molecule bicatenare.

**DNA**, acid deoxiribonucleic. Dacă alături de DNA nu se menționează conformația structurală (circulară, de exemplu) se înțelege că este vorba de DNA liniar, având caracteristicile structurale preconizate de modelul propus de Watson și Crick (1953).

**DNA recombinant**, moleculă de DNA obținută *in vitro* prin îmbinarea fragmentelor de DNA din specii biologice diferite sau a fragmentelor de DNA de la aceeași specie, îmbinate artificial în așa fel încât elementele genetice dobândesc o structură aparte. În alți termeni, este vorba de îmbinarea unui vector cu un pasager (vezi mai departe). Trebuie precizat că în acest caz se înțelege o moleculă de DNA cu o structură autonomă, care este biologic activă în celula-gazdă, fie în cromozom, fie extracromozomal.

**E. coli**, tulpină de bacterie *Escherichia coli*.

**Enzime de modificare**, enzime care produc metilarea unor nucleotide cuprinse în secvența cu care interacționează enzimele de restricție. În anumite cazuri, enzimele de restricție acționează și ca enzime de modificare.

**Enzime de restricție**, enzime nucleolitice care scindează DNA *in vitro* sau *in vivo*, după interacțiunea lor cu o secvență nucleotidică particulară din catena moleculei de DNA.

**Episom**, fragment circular de genă.

**Exon**, porțiune de DNA care codifică pentru un mRNA matur.

**Experiment de tip „shotgun”**, modalitate de obținere a DNA recombinant prin combinarea întâmplătoare a pasagerului dorit (aflat într-un amestec care conține și alți pasageri nedoriți). În acest tip de experiment pasagerul nu este deci purificat. El se găsește printre fragmentele de DNA cromozomal scindat de către enzime de restricție, de unde este captat la întâmplare de către un vehicul.

**Excizie**, reversul integrării.

**Fenomen de restricție și de modificare**, fenomen observat la tulpini de bacterii producătoare de enzime de restricție care degradează DNA din bacteriofag crescut pe alte tulpini bacteriene gazdă, îndată ce acesta a fost introdus în celulă. În contrast, tulpina poate fi infectată cu bacteriofag numai dacă acesta a fost cultivat în prealabil pe aceeași tulpină, deoarece activitatea de modificare protejează atât DNA fagic să se reproducă, cât și DNA celular propriu față de enzimele de restricție (prin metilarea secvenței de recunoaștere a enzimei de restricție).

**G**, acid guanozinmonofosforic (în cazul structurii RNA) sau acid deoxiguanozinmonofosforic (în cazul structurii DNA).

**Gazdă**, celule receptoare care posedă material genetic introdus artificial prin intermediul DNA recombinant.

**Genă**, unitate genetică funcțională constând dintr-un fragment de moleculă de DNA (sau de RNA), cu o secvență specifică de nucleotide care conține informația genetică necesară pentru sinteza unui lanț polipeptidic sau pentru sinteza unei alte molecule.

**Gene cu potențial de hazard**, gene care sînt periculoase (*harmful*), patogene pentru om, animale, plante și/sau mediul înconjurător.

**Genom**, DNA conținut într-o celulă sau virus, reprezentînd un ansamblu de informații genetice. (În alți termeni, toate genele unui organism sau ale unui individ.) În cazul virusurilor genomul poate fi reprezentat și de către RNA exclusiv.



- Hazard biologic, biohazard** sau *potențial de biohazard*, posibilitatea ca unele microorganisme, bacterii sau virusuri, în principal, care au dobândit în mod artificial — prin intermediul moleculei de DNA recombinant — informații genetice noi, să devină periculoase pentru om și/sau mediul înconjurător.
- Heteroduplex**, moleculă bicatenară de DNA, formată din două catene diferite (provenite de la indivizi diferiți).
- Hibridare celulară**, transfer al unor cromozomi sau al unor gene din celulele unei specii (de exemplu, om) la o altă specie (de exemplu, plantă), în urma fuzionării artificiale a celor două specii de celule, facilitată de etilenglicol, virus Sendai sau chiar mecanic (cu ajutorul unui ac extrem de fin, care permite realizarea unei punți între citoplasmele celor două celule înainte de fuzionare).
- Hibridizarea DNA**, proces în timpul căruia se formează molecule hibride în care o catenă derivă de la o moleculă de DNA, iar cealaltă catenă de la o alta. Hibridizarea dovedește că moleculele de DNA a doi parteneri au secvența bazelor identică sau similară. Formarea moleculelor hibride este o măsură a relațiilor dintre acizii nucleici. Hibridizarea este dependentă de secvențele de baze, de masa moleculară, de forța ionică și de temperatura la care are loc procesul.
- Himeră**, (în tehnologia DNA recombinant), replicon construit artificial, din elemente genetice diferite.
- Inginerie genetică**, totalitatea operațiilor efectuate *in vitro* cu gene, cromozomi și uneori cu celule întregi, în scopul „construirii” unei structuri genetice cu proprietăți ereditare premeditate. Tehnologia DNA recombinant face parte din ingineria genetică și, deci, nu este sinonimă cu aceasta.
- Integrare**, recombinare în care elementele genetice sunt inserate.
- Intron**, secvență de nucleotide din genă, care este transcrisă dar nu apare în transcriptul final (mRNA).
- Îmbinarea genelor** („gene splicing”), operație prin care se atașează o moleculă de DNA de altă moleculă de DNA.
- Îmbinarea RNA** („RNA splicing”), îndepărtarea intronilor din mRNA precursor, pentru a asambla RNA matur.
- Linker**, fragment mic de DNA (în general de 4—10 baze) obținut sintetic și care conține un situs pentru o enzimă de restricție.
- Microorganism transformat**, microorganism care conține DNA recombinant inserat artificial.
- mRNA**, acid ribonucleic mesager.
- Mutație nonsens**, mutație care determină terminarea sintezei unui lanț polipeptidic.
- Ochre**, mutație condiționată de apariția codonului de terminare UGA.
- ori**, locul unde începe replicarea DNA.
- Palindrom** 1. Propozițiuni sau cuvinte care citite în ambele sensuri au același sens. (De exemplu, ELEVELE sau ELE FAC CAFELE). 2. (În tehnologia DNA recombinant). Secvențe de nucleotide din cele două catene de DNA din situsul de recunoaștere a enzimelor de restricție, care sînt identice citite în cele două sensuri. De exemplu, -G-A-A-T-T-C-. Deci secvența din catena de sus citită -C-T-T-A-A-G-  
dinspre stînga spre dreapta este identică cu secvența din catena de jos, citită dinspre dreapta spre stînga.
- Pasager**, fragment de DNA care conține una sau mai multe gene, obținut fie în urma scindării unui DNA nativ cu enzime specifice (de restricție), fie în urma sintezei sale enzimatică (în principal cu reverstrascriptază) sau chimice.
- Protecție biologică**, construirea prin tehnologia DNA recombinant sau printr-un alt procedeu de inginerie genetică a vehiculelor și a celulelor-gazdă, care datorită proprietăților lor biologice speciale nu pot trăi și disemina în mediul extern (laborator).
- Recombinare**, proces de formare a unui nou genotip, prin schimb de material genetic între doi parentali care diferă prin două sau mai multe proprietăți ereditare.



**Replicon**, entitate genetică capabilă de replicare autonomă în celulă (plasmidă, DNA virus SV40, DNA bacteriofag etc.).

**RNA**, acid ribonucleic.

**rRNA**, acid ribonucleic ribozomal.

**Sistem gazdă-vehicul**, sistem al unei celule-gazdă oarecare, care conține vehicul sau vehicule.

**T**, acid deoxitimidinmonofosforic (din structura DNA).

**TAA, TAG, TGA**, codoni din DNA implicați în terminarea sintezei mRNA.

**Tehnologia DNA recombinant**, toate procesele biologice și experimentale necesare pentru obținerea DNA recombinant.

**Transducție**, transferul materialului genetic de la o celulă la alta prin intermediul unui vector viral.

**Transfecție**, infecția unei celule cu DNA sau RNA izolat dintr-un virus.

**Transformare**, proces prin care celulele în stare competentă sînt capabile de a capta DNA liber, izolat din alte celule. Unele tulpini bacteriene pot fi făcute competente, ceea ce înseamnă că ele devin capabile să capteze DNA liber. În general, transformarea se rezolvă cu succes dacă DNA captat constă din fragmente de cromozom izolat din tulpini bacteriene apropiate.

**tRNA**, acid ribonucleic de transfer.

**U**, acid uridinmonofosforic (din structura RNA).

**UAG**, codon din mRNA responsabil de terminarea sintezei unei proteine. Induce mutație *amber*.

**Vehicul (vector)**, structură genetică obținută din DNA plasmidic, bacteriofagic, viral sau din alte surse, capabilă de a se replica autonom în celula-gazdă adecvată. Vehiculele pot fi combinate cu DNA străin (pasager) pentru a forma molecule de DNA recombinant. Vehiculele oferă DNA străin posibilitatea de a se reproduce în celula-gazdă.



## Introducere

*Ingineria genetică*, termen ce părea a caracteriza o noțiune de domeniul științifico-fantasticului, cu perspective optimiste de realizare într-un viitor foarte depărtat, constituie astăzi o realitate bine conturată în domeniul ce îl reprezintă, face zi de zi progrese uluitoare cu perspective încă greu de estimat în totalitate. Realizările spectaculoase obținute în ultimii ani au determinat o serie de oameni de știință să anticipeze că secolul viitor va fi dominat de ingineria genetică, așa cum secolul nostru a fost dominat de cuceririle fizicii, cu referire la fisiunea nucleară, explorarea cosmosului, calculatoarele electronice etc.

Ingineria genetică este definită ca *un ansamblu de metode și tehnologii efectuate in vitro cu gene, cromozomi și, uneori, cu celule întregi, în scopul „construirii” unei structuri genetice cu proprietăți ereditare premeditate*. Se poate deci afirma că această ramură nouă a biologiei inaugurează de fapt era intervenției active a omului asupra patrimoniului ereditar al organismelor.

Dintre toate procedeele folosite de ingineria genetică pînă în momentul de față, cea mai prodigioasă s-a dovedit a fi așa-numita *tehnologie a DNA recombinant*, ale cărei baze moleculare le prezentăm în această carte. Practic, această tehnologie — cu multiplele ei repercusiuni asupra dezvoltării științei și chiar asupra societății — a determinat de fapt trecerea unui obstacol ce părea greu de acceptat pentru biologie și anume transferul simplu al informației genetice de la o specie la altă specie. După cum este cunoscut, în natură prin procesul recombinării genetice se produce în mod curent, dar cu o frecvență relativ scăzută, transferul informației genetice numai între specii apropiate de organisme. Or, tehnologia DNA recombinant a stabilit metodologia pentru realizarea în eprubetă a fragmentării specifice a diferitelor genoame, a legării lor cu fragmente de DNA purtătoare ale unor informații genetice de interes și apoi a exprimării într-un sistem celular adecvat. Ea a creat deci posibilitatea de a combina după dorință molecule de DNA — sub-

stanțe macromoleculare în care este înscrisă informația ereditară a tuturor ființelor vii — de la specii de organisme total neînrudite și de a forma organisme noi, cu caracteristici neîntâlnite în natură: bacterii care „fabrică” ovalbumină, hormoni cerebrali umani și alte substanțe, pentru care inițial nu dispuneau de informația genetică necesară.

Pesibilitatea manipulării materialului genetic și a trecerii barierelor dintre specii se datorește unor descoperiri epocale privind structura și funcția DNA. Prima dintre acestea este cea realizată de grupul de cercetători condus de Avery (1944), care a stabilit în mod neechivoc că DNA înglobează în el informația genetică a organismului din care face parte și, ceea ce este esențial pentru tehnologia DNA recombinant, că DNA are capacitatea de a determina transformarea unui alt organism.

Dar, pînă a ajunge la stadiul actual al tehnologiei DNA recombinant, a mai fost nevoie de alte cîteva descoperiri, dintre care cele mai semnificative par a fi următoarele.

Este vorba în primul rînd de descoperirea structurii DNA de către Watson și Crick în 1953. Ea este considerată pe bună dreptate „un eveniment major al secolului nostru”, care a produs „o explozie în biochimie, transformînd știința” (Sir Lawrence Bragg, Premiul Nobel pentru fizică 1915). Într-adevăr, după această descoperire s-a produs un salt imens în cunoștințele noastre despre organizarea materiei vii, marcînd istoric „sfîrșitul începutului” erei noi a biologiei moleculare. Prin formularea structurii macromoleculare a DNA s-a reușit explicarea însăși a mecanismului proceselor biologice fundamentale pe care le guvernează DNA, și anume stocarea și transmiterea informațiilor ereditare. S-a ajuns în acest fel la materializarea caracterelor ereditare, care definesc speciile și indivizii *printr-o structură unică* pe care o găsim în toate moleculele de DNA, reunite sub forma unui singur sau mai multor cromozomi.

Universalitatea structurii macromoleculare a DNA a generat ceea ce părea logic la început, iar experimental a putut fi dovedit doar în 1966, și anume că există un singur cod genetic pentru toate organismele. De aici a rezultat concluzia că unitatea funcțională dintr-un DNA care condiționează existența unui caracter ar trebui să se poată replica și exprima în orice fel de celulă.

Dar, pentru a ajunge să se manipuleze genele diferitelor organisme și să se dovedească ipoteza de mai sus, era nevoie să se găsească modalitatea scindării fine și reproductibile a materialului genetic. Acest fapt a devenit realizabil prin descoperirea *enzimelor de restricție și modificare*, care au pus la îndemîna geneticienilor instrumente inestimabile pentru „chirurgia” moleculară.

Este important de menționat aici că această descoperire este rodul cercetărilor interdisciplinare, în care aspectele de microbiologie au fost armonios îmbinate cu cele biochimice: primele au conturat fenomenul de restricție și modificare (Linn și Arber, 1965) iar ultimile au permis stabilirea mecanismului lor de acțiune (Smith și Wilcox, 1970).



Însă, pentru obținerea moleculelor recombinante de DNA, adică a acelor molecule care au material genetic asamblat artificial, era nevoie de descoperirea enzimelor care pot realiza legarea, „sudarea” fragmentelor de DNA între ele. Aceste enzime, denumite *DNA ligaze*, au fost descoperite atât în celulele normale, cât și în celulele infectate cu virus, iar o serie de cercetători au dovedit că ele pot fi utilizate pentru legarea componentelor genelor sintetizate chimic (Sgaramella și Khorana, 1972), precum și pentru introducerea de gene noi în unele organisme (Jackson și colab., 1972).

Tehnologia DNA recombinant nu s-ar fi putut dezvolta fără acele descoperiri care să fundamenteze, pe de o parte, modalitatea de a introduce moleculele de DNA străine în celulă, pentru a induce transformarea celulară — notînd contribuția esențială a lui Mandel și Higa (1970) —, iar pe de altă parte, cercetările complexe ale lui Cohen și Boyer (1973), care au pus bazele construirii de molecule de DNA hibride, capabile de a se autoreplica în celule.

Un alt factor important care a contribuit la impetuoasa realizare a tehnologiei DNA a fost descoperirea lui Sharp și colab. (1973), care a permis vizualizarea directă a DNA printr-o metodă simplă. Cu ajutorul ei se realizează astăzi estimarea maselor moleculare ale fragmentelor de DNA, se stabilește modul de acțiune a diferitelor enzime de restricție, se selecționează și se purifică diferite gene etc. Pînă la apariția metodei lui Sharp și a colaboratorilor săi, fragmentele DNA se puteau aprecia prin metoda viscozimetriei, a ultracentrifugării și altele, în general mult mai greoaie, care aveau și dezavantajul de a necesita cantități mari de DNA pentru analiză, oferind însă rezultate mai puțin exacte.

În țara noastră cercetările de inginerie genetică cunosc o efervescență fără precedent. Orientate spre studii moderne de mare perspectivă, cu aplicații în domeniul medicinei, agriculturii, industriei, ele sînt implicate în îndeplinirea obiectivelor stabilite de programul dezvoltării multilaterale a României. Este bine cunoscut că proiectul „Program-directivă de cercetare științifică, dezvoltare tehnologică și de introducere a progresului tehnic în perioada 1981—1990 și direcțiile principale pînă în anul 2000” acordă o atenție deosebită cercetărilor de inginerie genetică, ce sînt chemate să participe la aprofundarea mecanismelor biologice fundamentale și să le aplice în practică.

În acest context, o serie de unități de cercetare cum sînt Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau”, Institutul „Dr. Ion Cantacuzino”, Institutul de Științe Biologice, Universitatea București și altele se preocupă intens de cercetări de inginerie genetică.

Astfel, în cadrul Laboratorului Central de Acizi Nucleici din Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau” se desfășoară cercetări de caracterizare a unor mutanți termosenzibili (ts) de virus herpes simplex, precum și cercetări de izolare, purificare și caracterizare fizico-chimică a

enzimelor de restricție și a unor vehicule curent utilizate în tehnologia DNA recombinant (DNA din virusul SV40, din fagul  $\lambda$ , din plasmide) în scopul elaborării unor noi mijloace terapeutice.

În Laboratorul de Genetică al Universității București s-au obținut varietăți haploide la mai multe specii de plante, realizare de mare interes pentru agricultura din țara noastră.

Cercetările întreprinse în cadrul Colectivului de Inginerie Genetică Bacteriană din cadrul Institutului de Științe Biologice București urmăresc atât elucidarea unor aspecte privind mecanismul molecular al fixării biologice a azotului, cât mai ales obținerea de noi bacterii fixatoare de azot — prin transfer de gene — în scopul aplicării lor sub formă de îngrășăminte bacteriene, care să ducă la creșterea fertilității solului.

AUTORII



## I. Relația acizi nucleici — proteine (GENERALITĂȚI)

Descoperirea și elucidarea relației existente între acizii nucleici și proteine reprezintă fără îndoială una dintre cele mai mari realizări ale secolului nostru. Pînă acum 30 de ani s-a crezut că proteinele conțin informația genetică necesară reproducerii lor. Cercetările sistematice asupra structurii și funcției proteinelor și acizilor nucleici au arătat însă că proteinele nu pot servi ca matrițe pentru propria lor replicare și ca atare ele nu pot funcționa ca elemente genetice. În schimb, s-a putut constata cu multă claritate că acizii nucleici sînt purtătorii informației genetice (*Avery* și colab., 1944; *Boivin* și colab., 1948 ș.a.). Totodată s-a dedus că ei nu pot realiza o serie de funcții catalitice indispensabile vieții celulare, funcții pe care le îndeplinesc proteinele. Ca o consecință a acestei situații a rezultat că, organizarea fundamentală a organismelor se bazează pe relația dintre acizii nucleici și proteine; în această relație interdependența este indispensabilă pentru existența și funcția ambelor componente esențiale ale tuturor celulelor. Rolul principal al acizilor nucleici este acela de a specifica, controla și dirija sinteza proteinelor, incluzînd în aceasta toate procesele care stabilesc structura lor primară, secundară și terțiară, timpul lor de apariție și rata lor de producere.

Imediat după descoperirea în anul 1953, de către Watson și Crick, a structurii „elicei duble” s-a ajuns la concluzia că informația genetică a organismelor este conservată în această moleculă, sub forma unei succesiuni de elemente numite nucleotide.

Mesajul genetic (informația genetică) pentru sinteza unei anumite proteine este înscris în dubla elice a acidului deoxiribonucleic (DNA) localizat în nucleul celular. Întrucît DNA nu participă direct la sinteza proteinelor, informația conținută în molecula lui este *transcrisă* cu ajutorul unei enzime specifice — denumită RNA polimerază DNA dependentă — într-un acid ribonucleic. Enzima realizează de fapt copierea secvenței bazelor DNA într-o secvență complementară de baze RNA. Datorită faptului că acidul ribonucleic transferă mesajul genetic de la

DNA la locul sintezei proteinelor, el este denumit acid ribonucleic mesager (mRNA). Acest acid nucleic, odată sintetizat în nucleu, traversează membrana nucleară și pătrunde în citoplasma celulei, unde prin intermediul particulelor ribozomale — componente formate din acid ribonucleic (rRNA) și proteine — se traduce mesajul conținut în secvența bazelor mRNA în proteine specifice, adică proteine avînd o anumită structură primară datorită secvenței acizilor aminați și o anumită configurație macromoleculară. Procesul de traducere a informației genetice, de sinteză propriu-zisă a proteinelor, este extrem de complex, iar etapele sale sînt în curs de descifrare. La realizarea acestui proces participă, alături de ribozomi și mRNA, și o serie de enzime, proteine specifice (factori ribozomali), precum și un acid ribonucleic specific, care transportă acizii aminați necesari înlănțuirii în proteine, motiv pentru care este denumit acid ribonucleic de transfer (tRNA). Transcrierea și traducerea informației genetice este redată schematic în fig. 1.

Fiecare proteină, care concretizează în final caracterul individului, este codificată de către un segment de DNA (genă). La celulele „procariote”, adică celulele care au un nucleu nedelimitat printr-o membrană

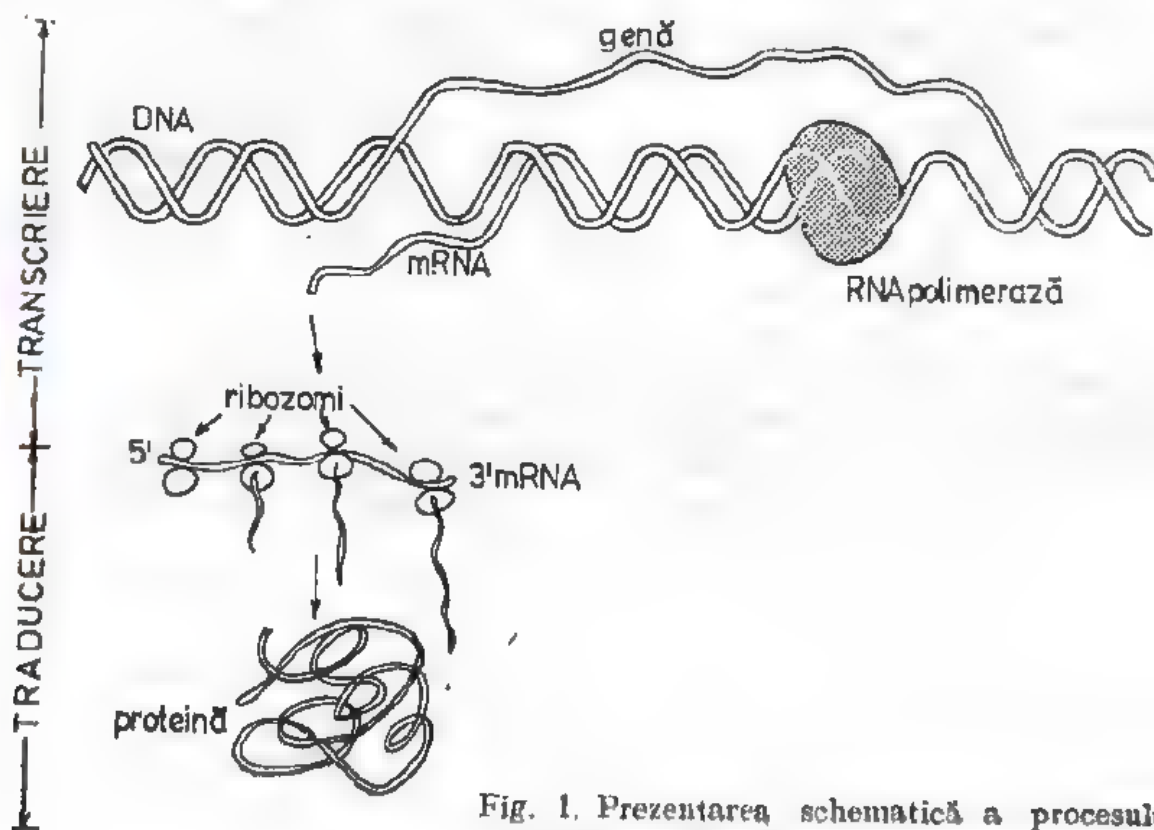


Fig. 1. Prezentarea schematică a procesului de transcriere și traducere a informației genetice.

nucleară (cazul bacteriilor), genele sînt colineare cu polipeptidele pe care le sintetizează. Cu alte cuvinte, la procariote mesajul genetic este înscris continuu, în interiorul genelor structurale nu există porțiuni netranscrise și netraduse.



## I. 1. „O genă — un polipeptid”

Din punctul de vedere al geneticii, dezvoltarea și funcționarea unui organism constă în mod esențial dintr-un sistem de reacții chimice integrate, controlate de către gene. Încă din anul 1941, s-a presupus că genele care fac parte dintr-un sistem, controlează și reglează reacțiile specifice, fie acționînd direct ca enzime, fie prin determinarea specificității enzimelor. Pentru a cunoaște relația existentă între gene și proteine (enzime), calea cea mai indicată s-a dovedit a fi aceea de a urmări schimbările structurii proteinelor în funcție de modificările induse în structura genelor.

Un astfel de studiu sistematic efectuat asupra unor mutanți de *Neurospora*, a căror creștere s-a dovedit a fi dependentă de un singur factor, a permis lui Beadle și Tatum (1941) să emită ipoteza „o genă — o enzimă”, conform căreia „gena și enzima sînt specificități de același ordin”. Cu alte cuvinte, o anumită genă este implicată în sinteza unei singure enzime sau a altei proteine. Cînd o genă este modificată, enzima devine defectivă sau, mai simplu, nu mai este produsă. Mai mult chiar, în perioada în care nu se cunoștea natura chimică a genei, iar structura proteinelor era insuficient elucidată, Beadle (1945) afirma că gena acționează ca moleculă „master” sau matriță, dirijînd configurația finală a moleculei proteice, așa cum este ea asamblată din părțile componente.

Cercetările ulterioare de biochimie și biologie moleculară, dintre care amintim pe cele realizate de Pauling (1949), Ingram (1957), Janofsky și colab. (1964), Sarabhai și colab. (1964) ș.a. au precizat însă că relația „o genă — o enzimă” este un caz particular al relației generale „o genă — un polipeptid”. Această relație, unanim acceptată azi, postulează că un segment de DNA reprezentînd o genă controlează sinteza unui singur polipeptid. Prin urmare, atunci cînd o proteină funcțională (o enzimă) este constituită din două sau mai multe polipeptide, acestea sînt sintetizate de gene distincte. După cum se va arăta relația „o genă — un polipeptid” este general valabilă, dar ea nu exclude existența unor excepții.

## I. 2. Particularități întîlnite la eucariote

O situație diferită de aceea de la procariote, în ceea ce privește organizarea și exprimarea informației genetice, se întîlnește la organisme eucariote, al căror nucleu celular este delimitat printr-o membrană. La păsările și mamiferele studiate pînă acum s-a observat că secvențe

lungi de deoxinucleotide care intră în constituția unei anumite gene nu sînt exprimate sub forma unor proteine.

S-a putut chiar preciza că aceste secvențe, care nu se exprimă, sînt intercalate între porțiunile de gene care sînt transcrise în mRNA și care deci dau naștere la proteine specifice. În consecință, conceptul de bază al coliniarității unei gene cu produsul polipeptidic pe care îl controlează, extins în mod natural la situația că secvența nucleotidelor pentru orice genă trebuie să fie continuă, a rămas valabilă doar pentru procariote (Flavell și colab., 1978).

Pentru a exprima situația nouă, descoperită la eucariote în ultimii ani, s-a introdus o nouă terminologie: porțiunile de gene care se exprimă au fost numite „*exoni*”, iar cele care nu se exprimă se numesc „*introni*”. De exemplu, gena ovalbuminei de găină este compusă din opt exoni și șapte introni (Kourilsky și Chambon, 1978); gena lanțului  $\beta$  globinei de om conține trei exoni și doi introni, iar gena catenei grele a imunoglobulinei de șoarece este formată din patru exoni și patru introni (Blanc, 1979).

Pentru exemplificare se va prezenta cazul relativ simplu al genei  $\beta$ -globinei de șoarece. Analiza ei structurală și funcțională a arătat că ea este codificată discontinuu și că fiecare locus genetic este mult mai complex decît s-a crezut inițial. Locusurile par a fi constituite într-un dispozitiv care conține mai multe porțiuni de gene autentice, alături de porțiuni de gene aparent inactive (Leder și colab., 1980).

Discontinuitatea genei  $\beta$ -globinei de șoarece a fost dovedită prin două analize diferite:

— în primul rînd, prin examenul electronoptic al hibridului rezultat din gena  $\beta$ -globinei și mRNA specific pe care îl codifică. Acest examen a arătat că hibridizarea are loc numai în anumite zone ale genei. De aici s-a dedus că în genă există secvențe de DNA care au corespondență în mRNA (exonii) — acestea sînt locurile unde se formează hibridul DNA-RNA — și secvențe de DNA care nu au corespondență în mRNA (intronii), sugerate de absența hibridizării (Leder și colab., 1977);

— în al doilea rînd, prin determinarea masei moleculare a mRNA precursor și matur. Întrucît primul a avut masa moleculară de 1,5 perechi de kilobaze (Kpb), iar al doilea numai de 0,6 Kpb, înseamnă că o bună parte din mRNA precursor este eliminată în cursul maturării mRNA (Curtiss și Weissmann, 1976). Schematic etapele principale ale maturării mRNA specific  $\beta$ -globinei de șoarece sînt redată în fig. 2.

Pînă în momentul de față funcția intronilor nu este cunoscută. După unii autori, intronii nu conțin nici un mesaj. Ei par a fi prezenți alături de exoni numai pentru a-i îndepărta. Procesul de îndepărtare



a intronilor se realizează în două etape. În prima etapă, RNA polimeraza DNA dependentă transcrie întregul mesaj genetic existent în genă, sintetizând un RNA pre-mesager, adică un precursor de mRNA. Acest RNA conține atât copia exonilor, cât și cea a intronilor. În a doua etapă, RNA pre-mesager este supus, tot în nucleu, unei opera-

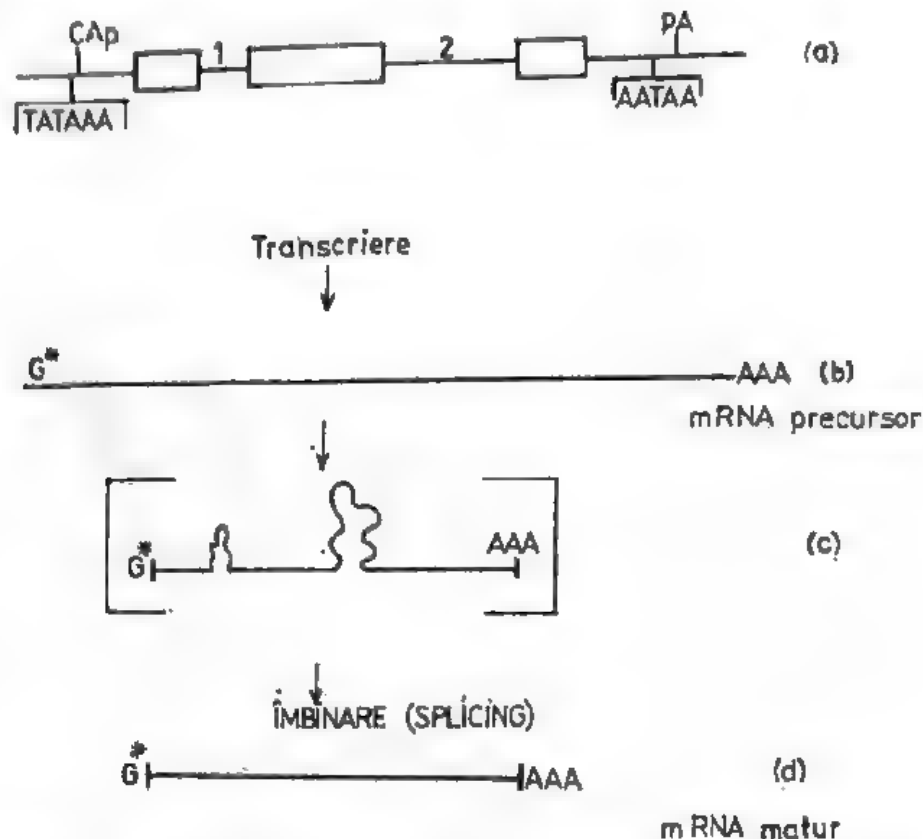


Fig. 2. Exonii și intronii  $\beta$ -globinei de șoarece. Linia continuă arată localizarea intronilor, iar cutiile — localizarea exonilor. a) TATAAA reprezintă „secvența Hogness” caracteristică promotorului, iar AATAA — secvența caracteristică terminatorului. Literele cAp identifică locul de începere a sintezei mRNA, iar literele pA identifică locul de începere a secvenței poli(A). b), c) și d) — etapele de maturare a mRNA (modificat după Leder și colab., 1980).

țiuni de excizie și îmbinare (*splicing*), ceea ce conduce la pierderea zonei intronilor. Această operațiune constă în scindarea enzimatică a intronilor în dreptul zonei care îi separă de exoni și anume în dreptul secvențelor GT și AT (sau AG) specifice frontierei de separație, urmată de îmbinarea exonilor între ei, pentru a da naștere unui mRNA care conține mesajul genetic continuu. În final, mRNA astfel sintetizat trece din nucleu în citoplasmă — unde — la nivelul ribozomilor — dirijează sinteza proteinelor pe care o codifică.

După cum au arătat Rogers și Wall (1980), *splicingul* intramolecular al mRNA — pus în evidență inițial la mRNA specifici adenovirusului — este un proces general care are loc în cursul exprimării

numeroaselor gene eucariote. Acest proces pare a fi condiționat de anumite secvențe nucleotidice din gene. Până în prezent s-au conturat trei clase de secvențe de DNA la locurile de splicing. Ele au fost puse în evidență în genele care controlează sinteza tRNA de cloroplaste, tRNA de drojdie și mRNA de vertebrate. Fiecare clasă are secvențe caracteristice. S-a remarcat că pentru vertebrate secvențele optime la locurile de splicing sînt următoarele:

5'-(exon)-A-G/G-T-A-A-G-T-A-(intron)  
-T-T-T-T-Y-T-T-T-T-T-C-T-T-N-C-.A-G/G-(exon)-3'

Catena de mai sus se referă la secvențele nucleotidelor de la capătul 5' al DNA, iar catena de jos la capătul 3' al DNA. Prima catenă are secvența ordonată împotriva, iar a doua în sensul de curgere a informației.

Secvența cea mai caracteristică a locului de splicing pare a fi:

5'-G-T-(intron)-A-G-3'

Cercetări foarte recente încearcă să izoleze și să caracterizeze enzimele de excizie și îmbinare a exonilor. Un grup de cercetători condus de Slonimski a făcut o comunicare în cursul anului 1980, comunicare în care s-a emis ipoteza existenței unor „proteine mesagere”, care au proprietatea de a îndepărta intronii inutili din gene. Într-o anumită fază aceste proteine îmbină exonii între ei, în așa fel încît mesajul devine continuu. Aceiași autori sugerează că proteinele mesagere ar fi responsabile și de transferul mRNA din interiorul nucleului spre citoplasmă și că informația pentru sinteza lor este înscrisă în zona intronilor. Este deci posibil ca intronii să aibă cel puțin această funcție. Datele experimentale existente sînt insuficiente pentru a generaliza sau preciza funcția exactă a intronilor. Este încă prea devreme să avem un răspuns clar la întrebarea: pentru ce organisme superioare (eucariote) au în DNA secvențe nucleotidice neexprimate (introni), în timp ce această situație nu se întîlnește la procariote?

Trebuie însă menționat că atît unele date experimentale, cît și unele analize teoretice pledează mai de grabă pentru atribuirea unui anume rol intronilor, decît a-i considera inutili. Astfel, Tonegawa și colab. (1978) arată că în cazul imunoglobulinelor, intronii sînt riguros intercalați între exonii care codifică părți moleculare proteice avînd fiecare funcții imunologice bine definite în cadrul imunoglobulinei. Tonegawa sugerează că diferiții exoni ai lanțului greu al imunoglobulinei iau naștere printr-o serie de duplicări ale unei gene primordiale. Prin această duplicare se realizează așezarea *in tandem* a noilor copii de exoni, iar intronii au rolul de a racorda exonii între ei.

Mai mult chiar, Tonegawa (1978), pe de o parte, și Gilbert (1978), pe de altă parte, susțin că intronii au un rol general în evoluția speciilor. Aceasta ar consta în facilitarea fuzionării secvențelor de DNA fără a deranja mesajul genetic al exonilor. În consecință, intronii nu sînt elemente inutile, ci dimpotrivă, ei contribuie la accelerarea evoluției orga-



nismelor superioare, pentru că ei condiționează aranjarea exonilor, ceea ce determină îmbogățirea patrimoniului ereditar cu unități genetice capabile să codifice proteine noi.

Prin urmare, la organismele superioare organizarea genelor este mult mai complicată decât la procariote. În plus, în transmiterea mesa-

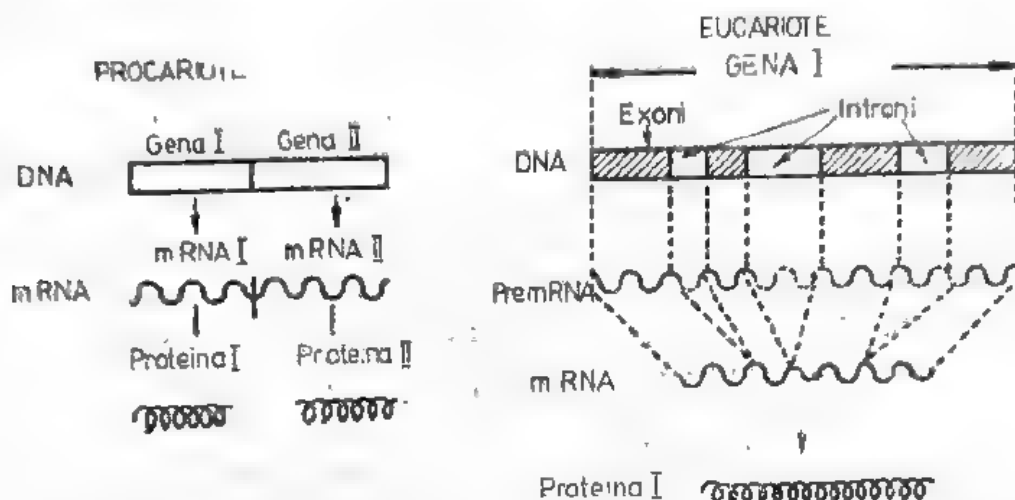


Fig. 3. Particularitățile structurale ale genelor procariote și eucariote.

jului genetic intervine și etapa de maturare a mRNA, inexistentă la organismele procariote. Aceste diferențe sînt schematic redată în fig. 3.

### I. 3. O genă generează mai multe proteine ?

Descoperirea exonilor și a intronilor în genele organismelor superioare sau a genelor discontinue (*discontinuous genes*) cum le numesc Flavell și colab. (1978), a generat ipoteza conform căreia la eucariote o genă poate genera mai multe proteine (Tonogawa și colab., 1978; Gilbert, 1978). Aceștia din urmă susțin că, cunoscuta relație, considerată dogmă a biologiei moleculare, „o genă — o proteină (enzimă)” trebuie înlocuită printr-un principiu nou, care poate fi redat prin: „o genă — mai multe proteine”. Ei arată că, teoretic, este posibil ca în momentul formării mRNA, numai unii exoni ai unei gene discontinue să fie legați împreună pentru a codifica o proteină de un anumit tip, în timp ce, în alte circumstanțe, exonii aceleiași gene îmbinați într-un alt mod, conduc la sinteza unei proteine de alt tip. Ca atare, o genă discontinuă ar conține de fapt informația genetică pentru mai multe tipuri de proteine. Cu toate că această ipoteză se bazează pînă în momentul de față pe relativ puține date experimentale — cazul imunoglobulinelor sau al unor virusuri, cum este virusul SV40, unde s-a observat formarea de

proteine noi, a căror existență a putut fi explicată doar prin noua ipoteză — ea trebuie reținută, întrucât se bazează pe existența exonilor și intronilor recent descoperiți, iar prezența lor clar dovedită va determina fără îndoială revizuirea cunoștințelor noastre de biologie moleculară.

Ideea aceasta este susținută și de Stark (1977) care consideră că proteinele multifuncționale sînt probabil sintetizate de către o singură genă. Aceste enzime, care catalizează reacții secvențiale sau asemănătoare, sînt organizate în complexe multienzimatice. Un astfel de aranjament asigură controlul alosteric al mai multor activități. Complexul enzimatic a fost pus în evidență în celulele eucariote. El poate fi constituit fie din diferite proteine monofuncționale legate între ele prin interacții necovalente, fie dintr-o singură unitate proteică avînd activități enzimatice multiple. După părerea lui Stark sinteza acestor enzime este dirijată de o singură genă după principiul „o genă - - mai multe enzime”, care este de fapt o excepție a principiului mai general „o genă - - un polipeptid”.

Un alt aspect al relației dintre genă și proteină, deosebit de important pentru tehnologia DNA recombinant, îl constituie exprimarea unor gene eucariote în sistem procariot. De exemplu, cazul particular al exprimării în celulele bacteriene a unor gene eucariote care codifică proteine complexe, cum sînt glicoproteinele.

Se pune următoarea problemă: bacteriile nu pot adăuga catenele de hidrați de carbon care sînt prezente în mod natural în molecula

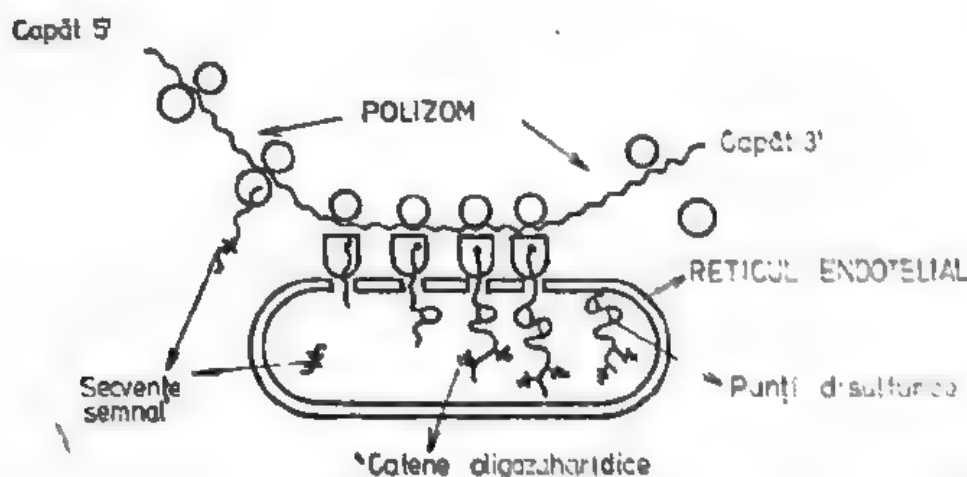


Fig. 4. Biosinteza proteinelor în celulele eucariote (după Palade, 1980).

glicoproteinelor sintetizate de celula eucariotă. Conform noilor date experimentale la eucariote adaosul de catene hidrocarbonate la polipeptide se face în momentul atașării polizomilor de membrana reticulilor endoplasmatici (fig. 4). În consecință, genele eucariote care codifică glicoproteine, introduse prin tehnologia DNA recombinant în bacterii pentru



a fi amplificate și exprimate vor genera doar partea proteică. De exemplu, interferonii sînt glicoproteine cu activitate antivirală (produse de celulele eucariote infectate cu virus) și care se exprimă cu o specificitate de specie caracteristică.

Întrucît s-a dovedit că interferonii au și un efect antitumoral remarcabil, producția industrială a interferonului a devenit azi o problemă de importanță majoră. Pentru a se ajunge la satisfacerea cerințelor de interferon s-a făcut apel și la tehnologia DNA recombinant. Cercetările întreprinse în acest scop au reușit să „determine” bacteria *E. coli* să producă interferoni umani (vezi pag. 250). Dacă rentabilizarea producției interferonului pe această cale rămîne o problemă de timp, ceea ce însă nu poate fi realizat în celulele bacteriene este adaosul de lanțuri oligozaharidice la interferonul sintetizat. Acest neajuns ar putea avea consecințe importante privind valoarea clinică a interferonului produs de bacterie (Weissman, 1980).

#### I. 4. Mecanisme de reglare a sintezei proteinelor

Introducerea unei gene (DNA) străine într-o celulă procariotă sau eucariotă în scopul exprimării ei nu se face la întîmplare. Gena trebuie să fie astfel plasată în noul sistem, încît să aibă orientarea corectă, adică ordinea nucleotidelor sale să se succedă în sensul în care se face transcrierea (spre dreapta sau spre stînga) de către aparatul de transcriere special al gazdei. În plus, printre altele, ea trebuie pusă sub controlul mecanismelor de replicare ale gazdei. De asemenea, este obligatoriu ca ea să conțină semnalele specifice de inițiere și oprire a biosintezei proteinei pe care o codifică și controlează.

Mecanismele care controlează exprimarea informației genetice la bacterii sînt astăzi în general cunoscute, în principal datorită cercetărilor remarcabile ale lui Jacob și Monod (1961). O serie de autori au încercat să adapteze aceste mecanisme la organisme superioare (eucariote). S-a observat însă, că mecanismele similare sînt mult mai complexe și că, în momentul de față, este dificil de lămurit chiar aspectele lor generale, datorită cunoașterii insuficiente a însăși structurii genoamelor organismelor eucariote.

Mai mult chiar, cercetările arată că nucleul celulelor eucariote conține o cantitate mare de DNA, care este în exces față de cantitatea de informație necesară codificării proteinelor celulare. Considerînd mărimea unei gene eucariote similară cu aceea a unei gene procariote medii, lungimea DNA dintr-o celulă umană fiind de aproximativ 2 m, înseamnă că un astfel de DNA conține mai mult de un milion de gene, valoare ce depășește cu un ordin de mărime numărul genelor estimate la om de

către geneticieni. Calcule de acest fel au condus la concluzia că la eucariote numai 10% din DNA codifică proteine, iar restul de DNA participă la mecanismele de reglare și control al genelor (Brandbury, 1978).

#### I. 4.1. Reglarea sintezei proteinelor la procariote

Studiul sistematic al unor protein-enzime bacteriene a arătat că sinteza lor se găsește sub control dublu genetic. Acest control condiționează specificitatea enzimei, cantitatea ei și momentul în care ea se produce. Modelul cel mai cunoscut de control genetic al sintezei proteinelor este cel descris de Jacob și Monod (1961) și care, în linii mari, este unanim acceptat și azi.

Principalele sale caracteristici sînt următoarele: structura moleculară a unei proteine este determinată de elementele specifice denumite *gene structurale*. Prin acțiunea lor se formează *transcriptul* (mRNA), *mesagerul structural* care, la rîndul lui, sintetizează proteina. Sinteza mesagerului, realizată de genele structurale, este un proces secvențial replicativ, care poate fi inițiat numai în anumite puncte ale DNA. Transcrierea genelor structurale depinde de un singur punct de inițiere care se numește *operator*. Genele a căror activitate este astfel coordonată formează un *operon*.

Mesagerul structural este o moleculă instabilă de RNA (mRNA), care este distrusă în cursul procesului de transfer de informație. Rata sintezei mRNA controlează rata sintezei proteinelor. Un grup special de molecule, denumite *represori*, decid momentul de producere a mRNA care codifică proteina respectivă. Represorii specifici împiedică sinteza uneia sau a mai multor proteine. Blocarea sintezei proteinelor se realizează în momentul în care represorii se atașază de operatori. În modelul original al reglării sintezei proteinelor, descris de Jacob și Monod (1961), natura represorului nu era clar definită. Se bănuia însă că ar fi un RNA(?) care, ce ar avea secvența nucleotidelor complementară secvenței nucleotidelor operatorului cu care interacționează prin intermediul legăturilor de hidrogen. Astăzi însă, se știe că represorii sînt de natură proteică. De exemplu, represorul  $\beta$ -galactozidazei este un tetramer cu masă moleculară de 160 000, constituit din patru polipeptide de 40 000.

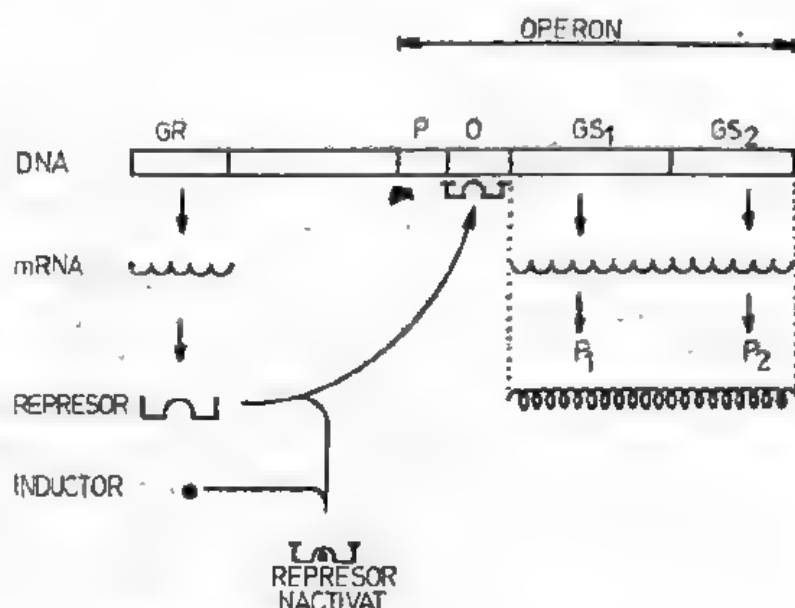
Represorii sînt codificați de *genele reglatoare*. Aceste gene nu contribuie cu informații structurale noi la sinteza proteinelor pe care le controlează. Represorii decid numai dacă proteinele controlate se sintetizează sau nu, cu alte cuvinte, decid funcționarea genelor structurale.

În anumite sisteme (sisteme de enzime inductibile), represorul tinde să se combine specific cu unele molecule mici, iar represorul combinat nu are afinitate pentru operator, ceea ce are ca rezultat activarea opero-



nului. În sistemele care determină sinteza enzimelor represabile, represorul însuși este inactiv, neavînd afinitate pentru operator. Combinîndu-se cu unele molecule mici (metaboliți specifici), el se activează, adică devine capabil de a se atașa de operator, blocîndu-i funcția. Moleculele mici care interacționează cu represorul au fost denumite *inductori* și

Fig. 5. Controlul genetic al sintezei proteinelor la procariote (modificat după Jacob și Monod, 1961).



*corepresori*, inductorii fiind molecule care inactivează, iar corepresorii — molecule care activează represorul.

În concluzie, sinteza unei proteine (enzime) într-o bacterie se găsește sub un dublu control (fig. 5). Pe de o parte, genele structurale determină organizarea (structura) moleculară a proteinei. Pe de altă parte, alți determinanți genetici — denumiți gene reglatoare — controlează rata sintezei proteinelor prin intermediul represorilor. Aceștia pot fi inactivați de inductori sau activați de corepresori, care sînt metaboliți specifici. Acest sistem de reglare operează prin intermediul mRNA sintetizat de gene, care la nivelul ribozomilor dirijază sinteza proteinelor.

#### I.4.2. Cîteva date privind transcrierea informației genetice

S-a arătat că în reglarea sintezei proteinelor atît genele structurale care formează operonul, cît și genele reglatoare, operează prin intermediul mRNA, care dirijază direct sinteza proteinelor structurale cu funcție represoare (represorii). Sinteza intermediarului reprezintă de fapt însuși procesul de transcriere. Acesta este un proces complex, prin care informația genetică existentă în DNA este transferată moleculelor de mRNA cu funcție de mesager. Procesul este realizat de un ansamblu de componente care formează împreună aparatul de transcriere și care

trebuie să funcționeze cu maximum de fidelitate asigurând ca mesajul genetic să fie corect înregistrat în mRNA. Fidelitatea și specificitatea transcrierii este asigurată atât de interacțiuni de tipul celor existente între perechile de baze complementare — deci de tip acid nucleic-acid nucleic — cît și de interacțiuni de tip acid nucleic-proteină. În acest proces matrița este DNA (genele), iar copia sau transcriptul este mRNA. Rezultatul transcrierii este transformarea secvenței nucleotidelor unui segment de DNA într-o secvență complementară de nucleotide ale unui mRNA. În terminologia curentă, regiunea genei (matriței) care inițiază sinteza mRNA se numește *promotor*, iar regiunea genei care determină oprirea sintezei mRNA — *terminator*. Regiunea cuprinsă între promotor și terminator se numește *unitate de transcriere*.

Procesul de transcriere începe prin recunoașterea locului de inițiere (promotorul) a sintezei mRNA existent pe DNA de către factorul  $\sigma$ , care este unul dintre cele patru tipuri de subunități ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  și  $\sigma$ ) ale RNA polimerazei DNA dependente, enzima care dirijează sinteza mRNA.

Studiul legării RNA polimerazei și a represorilor de DNA a precizat poziția promotorilor și operatorilor. Promotorii — locurile de fixare puternică a RNA polimerazei, de unde începe transcrierea mRNA — sînt localizați foarte aproape de operatori — locul specific de fixare a represorilor.

În locul în care s-a atașat RNA polimeraza se produce desfacerea celor două catene ale matriței, iar enzima inițiază sinteza mRNA în direcția 5'--3'. Numai una dintre catenele matriței de DNA este transcrisă (transcriere asimetrică). După inițierea sintezei mRNA, factorul  $\sigma$  se detașază de corpul enzimei (constituit din subunitățile  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ), care continuă sinteza mRNA. Factorul detașat este capabil de a se lega de un alt corp de RNA polimerază, pentru a iniția un alt ciclu de transcriere. Terminarea sintezei mRNA este condiționată de un semnal, existent sub forma unei secvențe specifice de baze în molecula DNA, pe care îl recunoaște o proteină specifică denumită factorul  $\rho$ .

### I.4.3. Semnificația unor secvențe de nucleotide din DNA

În etapa actuală a cercetărilor de biologie moleculară, genele se obțin prin trei metode diferite:

- prin izolare cu ajutorul enzimelor de restricție din genomul celular sau viral;
- prin sinteză enzimatică, utilizînd ca matriță mRNA și enzima de sinteză reverstranscriptaza;
- prin sinteză chimică, utilizînd procedeele chimiei organice.

Pentru ca genele să devină funcționale, adică să fie capabile să se exprime în momentul în care sînt introduse prin tehnologia DNA recom-



binant într-un sistem bacterian adecvat, ele sînt izolate, sintetizate sau pregătite astfel încît să conțină semnalele adecvate transcrierii și traducerii lor.

Așa cum au precizat foarte recent Riggs și Itakura (1979), există dovezi evidente că genele eucariote funcționează în bacterii și că nu există nici o barieră fundamentală care să împiedice transcrierea și traducerea genelor eucariote în procariote. Cheia exprimării eficiente pare a fi prezența în genele străine a semnalelor adecvate în poziția corectă. De asemenea, gena eucariotă introdusă trebuie să fie în fază, să conțină un situs care determină legarea la ribozom, să fie în aval de un promotor bun și să conțină situsurile de inițiere și terminare a traducerii.

**I.4.3.1. Secvențele promotorului și inițiatorului.** Referitor la secvențele nucleotidelor din zona promotorului se poate spune că, pînă în prezent, nu există o definiție concisă și universală a promotorului la nivel de nucleotide. Cu toate că s-au determinat secvențele nucleotidelor pentru mai mulți promotori se remarcă existența unei slabe omologii între ei. Ceea ce devine însă evident este faptul că majoritatea promotorilor conțin numeroase perechi de baze A: T (Calos, 1978).

În bacterii, RNA polimeraza interacționează cu o regiune a DNA care cuprinde aproximativ 40 de baze situate înaintea locului de inițiere a transcrierii (Gilbert, 1976). Aceasta ar fi deci zona promotorului. Cea mai bine definită zonă a promotorului este „cutia Pribnow“, care conține secvența TATPuATG localizată înaintea locului de pornire a sintezei mRNA (Maxam și colab., 1977). Ulterior s-a arătat că secvențele TATAAA (Galibert și colab., 1979) sau TATAAATA (Soeda și colab., 1980) corespund semnalului de inițiere a transcrierii.

De asemenea, este important de menționat existența codonilor specifici pentru inițierea transcrierii. Dintre aceștia cel mai cunoscut este codonul ATG, frecvent întîlnit în poziția în care începe transcrierea mRNA (Galibert și colab., 1979; Soeda și colab., 1980).

**I.4.3.2. Secvențele terminatorului.** Analiza secvenței nucleotidelor din zona genelor unde se termină transcrierea mRNA a pus în evidență prezența unor triplete de nucleotide (codoni) specifice de tipul TAG, TGA, TAA. Prezența lor în aceste locuri a fost corelată cu posibila lor funcție ca semnale de terminare a sintezei mRNA și, în consecință, de terminare a lanțului polipeptidic (Soeda și colab., 1980). Și în acest caz este de remarcat că, pentru moment nu există o definiție universală a terminatorului la nivel de nucleotide. Totuși, regiunile de nucleotide homopolimerice de tip ...AAAAA... (Adhya și Gottesman, 1978)

...TTTTT...

sau secvențele AATAA (Leder și colab., 1980) par a fi implicate în terminarea transcrierii.

**I. 4.3.3. Secvența Shine-Dalgarno.** Pe baza unor observații experimentale, Shine și Dalgarno (1974) au emis ipoteza conform căreia nucleotidele terminale ale rRNA 16S au un rol esențial în legarea mRNA de subunitatea ribozomală 30S<sup>1</sup>. Elucidarea structurii primare a capătului 3' al rRNA 16S, precum și a locului de legare de ribozom a mai multor mRNA a sugerat că interacțiunea mRNA-rRNA 16S este într-adevăr esențială pentru procesul de recunoaștere. Ribozomul selecționează locul corect de legare a mRNA datorită interacțiunii dintre secvența nucleotidelor de la capătul 3' al rRNA 16S și o secvență scurtă, complementară, din mRNA, situată aproape de codonul de inițiere (Baan, 1977).

Pe de altă parte, așa cum s-a arătat, exprimarea genelor străine introduse prin tehnologia DNA recombinant în celulele bacteriene depinde de existența alături de aceste gene, a secvențelor de baze care codifică locul de legare a mRNA de ribozom (Emtage și colab., 1979; Riggs și Itakura, 1979).

Structura primară a capătului 3' al rRNA 16S implicat în legarea mRNA este 5'...AUCACCUCCUA<sub>OH</sub> 3' (Sprague și Steitz, 1975), iar secvențele de nucleotide din DNA care codifică regiuni ale mRNA, responsabile de atașarea de ribozom, au probabil următoarea structură: TCTTCTG, CTTC, CCTTC (Soeda și colab., 1980). Aceste secvențe sînt cunoscute în literatură sub denumirea de „secvențe Shine-Dalgarno” sau pe scurt secvențe SD.

**I.4.3.4. Elementele genetice esențiale necesare exprimării unei gene eucariote în sistem procariot.** Sinteza unei proteine eucariote într-un sistem procariot depinde, în mod esențial, de locul în care a fost introdusă gena structurală care codifică proteina respectivă, în raport cu elementele genetice care controlează transcrierea și traducerea unui operon din gazdă. Astfel, cercetări foarte recente, care vor fi prezentate ulterior au arătat că celulele bacteriene pot sintetiza insulină, ovalbumină și multe alte proteine eucariote, numai atunci cînd genele corespunzătoare au fost introduse sub controlul genetic al unui operon adecvat.

Unii cercetători au izolat regiunea de control a operonului *lac* (Itakura și colab., 1977), iar alții regiunea de control a operonului *trpE* (Emtage și colab., 1979) din bacteria *E. coli* și le-au utilizat pentru exprimarea genelor străine. Elementele esențiale ale operonului *lac* sînt: promotorul, operatorul, locul de inițiere a sintezei mRNA, locul atașării de ribozom, secvența de nucleotide corespunzătoare sintezei β-galactozidazei (Heyneker și colab., 1976). După cum precizează Riggs și Itakura (1979), secvența locului de atașare de ribozomi este necesară

<sup>1</sup> Subunitatea ribozomală de 30S este formată din rRNA și din 21 proteine diferite.



numai atunci cînd se urmărește sinteza unei proteine ca atare, și nu sub formă de peptid precursor. În practică, se izolează sau se sintetizează întii aceste elemente, care se cuplează apoi cu gena străină. Produsul fuzionat se introduce într-un vehicul bacterian adecvat pentru a fi exprimat. De exemplu, în cazul în care s-au cuplat elementele operonului

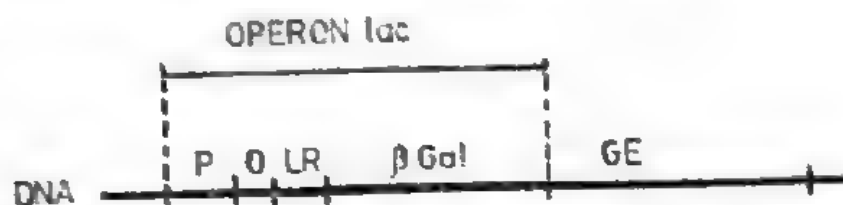


Fig. 6. Poziția corectă a unei gene eucariote (GE), introdusă într-un sistem procariot, față de principalele elemente de control ale unui operon *lac*: P — promotor; O — operator; LR — loc de legare la ribozom;  $\beta$ -Gal — gena structurală a  $\beta$ -galactozidazei. Plasată în această poziție gena eucariotă se poate exprima în celula bacteriană.

*lac* cu gena insulinei, bacteria transformată va sintetiza o proteină fuzionată, conținând  $\beta$ -galactozidază și insulină (Riggs și Itakura, 1979). Poziția genei străine față de elementele esențiale de control este prezentată schematic în fig. 6.

### Bibliografie

1. Adhya, S., Gottesman, M.A., *Rev. Biochem.*, **47**, 967 (1978).
2. Avery, O., McLeod, C. M., McCarty, M., *J. Exp. Med.*, **79**, 137 (1944).
3. Baan, R.A., Teză de doctorat, Leiden (1977).
4. Beadle, G. W., Tatum, E.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **27**, 499 (1941).
5. Beadle, G.W., *Chem. Rev.*, **37**, 15 (1945).
6. Blanc, M., *La Recherche*, **10**, 896 (1979).
7. Boivin, A., Vendrely, R., Vendrely, C., *C.R. Acad. Sci. Paris*, **226**, 1061 (1948).
8. Brandbury, M., *La Recherche*, **91**, 644 (1978).
9. Calos, M.P., *Nature*, **274**, 762 (1978).
10. Curtis, P.J., Weissmann, C., *J. Mol. Biol.*, **106**, 1061 (1976).
11. Emtage, J.S., Tacon, W.C.A., Catlin, G.H., Jenkins, B., Porter, A.G., Carey, N.H., *Nature*, **283**, 171 (1980).
12. Flavell, R.A., Glover, D.M., Jeffreys, A.J., *TIBS*, noiembrie 241 (1978).
13. Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P., *Nature*, **281**, 646 (1979).
14. Gilbert, W., in *RNA polymerase*, ed. Lasick, R & Chamberlin, M. p. 193 (1976).
15. Gilbert, W., *Nature*, **207**, 501 (1978).
16. Heyneker, H.L., Shine, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W., Rosenberg, J., Dickerson, R.E., Narang, S.A., Itakura, K., Linn, S., Riggs, A.D., *Nature*, **263**, 748 (1976).
17. Ingram, V., *Nature*, **180**, 326 (1957).
18. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
19. Jacob, F., Monod, J., *J. Mol. Biol.*, **3**, 318 (1961).
20. Kourilsky, P., Chambon, P., *Trends Biochem. Sci.*, noiembrie 244 (1978).
21. Leder, P., Tilghman, S.M., Tiemeier, D.C., Polsky, F.I., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 915 (1977).

22. Leder, O., Hansen, N.J., Konkel, D., Leder, A., Nishloka, Y., Talkington, C., *Science* **209**, 1336 (1980).
23. Maxam, A.M., Tizard, R., Skryabin, G.K., Gilbert, W., *Nature*, **267**, 644 (1977).
24. Palade, G.E., „Aspecte celulare ale secreției proteinelor”, conferință, București 15 iulie (1980).
25. Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J., Wells, I.C., *Science* **110**, 543 (1949).
26. Riggs, A.D., Itakura, K., *Am. J. Human. Gen.*, **31**, 531 (1979).
27. Rogers, J., Wall, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **77**, 1877 (1980).
28. Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.G., Goulson, A.R., Fiddes, I.C., Hutchinson, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M., *Nature*, **265**, 687 (1977).
29. Sarabhai, A., Stretton, O.W., Brenner, S., Bolle, A., *Nature*, **201**, 13 (1964).
30. Shine, J., Dalgarno, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **71**, 1342 (1974).
31. Slonimski, P., *Science et vie*, **750**, 58 (1980).
32. Soeda, E., Arrand, J., Smolar, N., Walsh, J., Griffin, B., *Nature*, **283**, 445 (1980).
33. Sprague, K.U., Steitz, J.A., *Nucleic Acids Res.*, **2**, 787 (1975).
34. Stark, G.R., *TIBS*, **2**, 64 (1977).
35. Tonegawa, S., Maxam, A.M., Tizard, R., Bernhard, O., Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 1485 (1978).
36. Weissman, C., *Nature*, **283**, 323 (1980).
37. Yanofsky, C., Carlton, B.C., Guest, J.R., Helinski, D.R., Henning, U., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **51**, 266 (1964).



## II. Tehnologia DNA recombinant

De la bun început trebuie precizat că tehnologia DNA recombinant nu este sinonimă cu ingineria genetică. Aceasta din urmă include toate procedeele efectuate *in vitro* cu gene, cromozomi și uneori cu celule întregi în scopul „construirii” unei structuri genetice cu proprietăți ereditare premeditate. Or, tehnologia DNA recombinant se referă numai la metodologia obținerii de DNA recombinant, adică de realizarea *in vitro* a unor molecule de acid deoxiribonucleic prin îmbinarea fragmentelor de DNA din specii biologice diferite sau chiar a fragmentelor de DNA de la aceeași specie biologică, aranjate însă artificial, în așa fel încât elementele genetice dobîndesc o structură aparte. Rezultă că tehnologia DNA recombinant este o parte integrantă a ingineriei genetice, care de fapt cuprinde o sferă mai largă de procedee.

Dintre celelalte procedee ale ingineriei genetice merită a fi menționate hibridarea celulară, de exemplu, care realizează transferul unor cromozomi sau a unor gene din celulele unei specii la o altă specie cu ajutorul fuzionării artificiale — facilitată de un virus sau de o substanță chimică — a celor două specii de celule. Sau așa-numitul procedeu „al lui Gurdon” — în care nucleul unei celule somatice conținând întreaga informație genetică a unui organism (broasca, în experimentele lui Gurdon) este separat și introdus într-un ou denucleat, aparținând aceleiași tip de organism. În condiții experimentale speciale, acest ou se dezvoltă normal și produce un organism identic cu cel din care provine nucleul. Se oferă în acest fel posibilitatea multiplicării, în mod premeditat, a unui număr nelimitat de indivizi cu proprietăți identice.

## II.1. Schema generală a tehnologiei DNA recombinant

### II.1.1. Vehicul sau vector

Introducerea într-o celulă a unei singure gene sau a mai multor gene noi, în speranța că ele se vor exprima și menține, nu este posibilă. Odată ajunse în celule aceste gene vor fi imediat distruse de către DN-azele celulare omniprezente în fragmente, iar informația genetică pe care o conțin va fi total pierdută. Ca operația să reușească este nevoie ca genele noi — purtătoare ale informațiilor genetice pe care dorim să le dobîndească un organism dat, să fie „sudate” de o moleculă de DNA care are proprietatea de a fi acceptată de celule și, în plus, să aibă și capacitatea de a se automultiplica în celulele respective. În acest fel am definit chiar termenul frecvent folosit în tehnologia DNA recombinant de *vehicul* sau *vector*, capabil de a transporta gena(ele) și de a le multiplica în celule. Este de remarcat că vehiculul este de fapt ceea ce definește Jacob și colab. (1963) un *replicon*, adică o entitate genetică capabilă de replicare autonomă în celulă. Rolul de vehicul îl poate avea atât DNA plasmidial (în principal plasmidele din *E. coli* sînt preferate pentru motivele arătate în continuare), cît și DNA din bacteriofagul  $\lambda$ , virusul SV40, adenovirus sau alte virusuri. În general, vehiculele sînt molecule de DNA circulare.

### II.1.2. Pasager

Un alt termen pe care îl definește tehnologia DNA recombinant este acela de *pasager*. Prin acesta se înțelege fragmentul de DNA străin conținînd gena sau genele de interes care se introduc în vehicul pentru multiplicare. Pasagerul poate fi izolat sau preparat prin mai multe metode și anume:

a) metoda izolării cu enzime specifice: DNA conținînd gena de interes este fragmentat cu enzime de restricție. Urmează apoi identificarea fragmentului care conține gena, izolarea și pregătirea lui pentru a-l introduce în vehicul;

b) metoda enzimatică: se izolează mai întîi RNA mesager care dirijează sinteza unei proteine anumite pe care dorim să o multiplicăm (insulina, de exemplu). Etapa următoare cuprinde sinteza genei pentru proteina respectivă folosind RNA mesager izolat ca matriță și revers-transcriptază ca enzimă de biosinteză. Aplicarea metodei este limitată în multe cazuri de dificultatea izolării mRNA;

c) metoda chimică: se realizează cu ajutorul tehnicilor dezvoltate de chimia organică, a sintezei chimice a genei de interes fără



intermediul unui tipar genetic preexistent. Înainte de a începe sinteza genei este deci necesar să se cunoască secvența nucleotidelor sale. Această metodă va deveni în viitor cea mai accesibilă.

Menționăm că cele trei metode au fost folosite cu succes pentru izolarea de gene atât în tehnologia DNA recombinant, cât și în alte scopuri.

### II.1.3. Deschiderea vehiculului

Pentru a introduce însă pasagerul în vehicul este necesar în primul rând să se producă scindarea specifică a vehiculului, mai ales că acesta, așa cum am precizat mai înainte, este în general o moleculă circulară de DNA. Scindarea sau deschiderea moleculei circulare trebuie însă astfel efectuată încât funcția ei esențială de autoreplicare să nu fie afectată. Locul scindării nu trebuie să fie deci situat, de exemplu, în acea zonă a moleculei care controlează sinteza DNA sau anumite funcții esențiale. De asemenea, este de preferat ca scindarea să se facă doar într-un singur loc al moleculei, obținându-se doar conversia moleculei circulare într-o moleculă liniară. Pentru a se realiza acest deziderat în tehnologia DNA recombinant se folosesc enzimele de restricție. Aceste enzime, foarte recent descoperite, „fragmentează DNA *in vitro* numai după interacțiunea — care poate reprezenta, de fapt o etapă de activare — cu o secvență particulară de nucleotide în interiorul lanțului molecular al DNA” (Arber, 1977) și permit scindarea în locuri limitate a moleculelor de DNA.

Dacă scindarea vehiculului s-a făcut cu aceeași enzimă de restricție cu care s-a făcut și izolarea pasagerului, înseamnă că cele două molecule de DNA vor avea capetele cu secvență nucleotidică identică, fiindcă o anumită enzimă de restricție scindează întotdeauna în dreptul unei secvențe particulare de nucleotide. Mai mult chiar, unele enzime de restricție generează capete coezive (*sticky ends*) la moleculele de DNA pe care le scindează. Ca atare, există posibilitatea ca datorită acestei particularități capetele vehiculului să se lipească de capetele pasagerului, obținându-se o moleculă hibridă care cuprinde atât vehiculul, cât și pasagerul. Nu trebuie omisă însă și cealaltă alternativă și, anume, cea care produce autocircularizarea fragmentelor de DNA.

### II.1.4. Formarea de capete coezive la vehicul sau/și pasager

Uneori folosirea enzimelor de restricție nu este indicată pentru izolarea pasagerului, fiindcă ele determină scindarea moleculei exact în zona genci de interes. Pe de altă parte, unele enzime de restricție generează capete tocite (*blunt ends*) la moleculele de DNA ale vehi-

culului sau ale pasagerului, care nu se pot lipi specific. În aceste cazuri, atașarea pasagerului de vehicul se poate face numai dacă se construiesc artificial capete coezive. Se folosesc în acest scop mai ales două metode speciale:

— prima metodă constă în adăugarea, cu ajutorul transferazei terminale, unor secvențe de poli (dA), la capetele vehiculului, și de secvențe de poli (dT) la capetele pasagerului. Prin același procedeu se pot crea capete coezive de poli (dG) la vehicul și de poli (dC) la pasager. În acest fel s-a creat situația ca cei doi parteneri (vehicul și pasager) să aibă capete nucleotidice complementare (deci coezive). Dacă se amestecă, ei se unesc prin capetele lor cu ajutorul legăturilor de hidrogen care se formează în baza complementarității nucleotidelor terminale astfel încât capetele cu poli (dA) se unesc cu capetele cu poli (dT), iar în cealaltă alternativă, capetele cu poli (dG) se unesc cu capetele cu poli (dC):

— a doua metodă, des folosită datorită spectrului ei mai larg de aplicare, constă în sinteza chimică a secvențelor de nucleotide (de obicei decameri), specifice locului de interacțiune a enzimelor de restricție cu DNA și legarea (sudarea) lor prin intermediul unor enzime particulare (ligaze) de vehicul sau/și pasager.

### II.1.5. Legarea pasagerului de vehicul

Tratamentele anterioare care au creat capete coezive la vehicul și pasager au avut ca scop doar potrivirea corectă și specifică a capetelor celor două molecule. Legăturile de hidrogen între capetele coezive ale vehiculului și ale pasagerului în urma amestecării lor nu sînt suficient de puternice ca să confere moleculei hibride stabilitate față de condițiile fiziologice din celulă. Pentru ca molecula de DNA nou construită din vehicul și pasager să devină o unitate stabilă este necesară legarea (sudarea) capetelor lor prin legături covalente. Aceasta se realizează prin tratarea amestecului de vehicul și pasager cu o DNA ligază, enzimă care are proprietatea de a induce formarea legăturilor covalente între moleculele de DNA. Prin urmare, numai după ce s-a produs sudarea pasagerului de vehicul prin legături covalente, cu ajutorul DNA ligazei, s-a ajuns la o moleculă de DNA recombinant adevărată care, așa cum s-a precizat, prezintă caracteristica principală de a fi rezultatul îmbinării artificiale a două segmente de DNA din specii biologice diferite sau din aceeași specie biologică, dar cu un aranjament particular al segmentelor, aranjament neîntîlnit în natură.



## II.1.6. Poziția pasagerului în vehicul

Aspecte fundamentale ale acestui subiect au fost prezentate anterior motiv pentru care aici vom sublinia doar pe cele legate de poziția și exprimarea eficientă a pasagerului în vehicul. Plasarea pasagerului în poziția corectă, față de elementele genetice ale unui operon este obligatorie. Transcrierea și traducerea pasagerului poate fi realizată numai dacă, plasat în vehicul, ordinea secvențelor nucleotidelor sale este în concordanță cu sensul transcrierii și ocupă o poziție în aval de promotorul, operatorul și o genă structurală a unui operon adecvat. Situația este oarecum similară cu aceea a unei benzi de magnetofon, care poate fi ascultată numai atunci când este introdusă corect în aparat.

## II.1.7. Introducerea și exprimarea DNA recombinant în celule

Odată ce construirea DNA recombinant a fost realizată, acesta este introdus în celulele receptoare adecvate pentru multiplicare. Dacă vehiculul este o plasmidă sau bacteriofagul  $\lambda$ , gazda va fi o tulpină bacteriană (*E. coli*, în principal), în timp ce folosirea DNA din virusul SV40 ca vehicul impune utilizarea unor culturi celulare animale, cum este cultura de celule CV-1P. Introducerea DNA recombinant în celulele receptoare adecvate se face prin fenomenul de transformare. Acest fenomen a fost observat pentru prima dată de Griffith (1929) și lămurit la nivel molecular printr-o experiență crucială de către Avery și colab. (1944). Transformarea este fenomenul prin care celulele aflate în stare de „competență” reușesc să accepte ireversibil molecule de DNA izolate de la alte celule și să dobândească prin aceasta proprietăți noi. Într-o cultură de bacterii receptoare sau într-o cultură celulară nu toate celulele sînt susceptibile de a capta DNA. Celulele care se găsesc într-o stare fiziologică particulară și acceptă DNA străin (DNA recombinant sau DNA transformant) se numesc celule în *stare de competență*. Starea aceasta este condiționată de o serie de factori, printre care amintim anumite faze ale ciclului de diviziune celulară, specia bacteriană, etapa fiziologică de creștere, mediul de cultură. Tratarea celulelor cu  $\text{Ca}^{2+}$ , de exemplu, determină creșterea substanțială a numărului de celule aflate în stare de competență, motiv pentru care pentru introducerea DNA recombinant în celule se folosește în mod curent acest procedeu.

Descoperirea acestui tratament de către Mandel și Higa (1970) a avut un rol fundamental pentru cercetările de tehnologie a DNA

recombinant. Aceasta deoarece, pînă la publicarea lucrării lui Mandel și Higa, acizii deoxiribonucleici extrași cu fenol din colifagii temperați  $\lambda$ , 434, 186 sau P2 reușeau să infecteze *E. coli* numai în prezența unui „fag ajutător”, al cărui rol exact nu era cunoscut (Mandel, 1967). Or, tulpina de *E. coli* — K12 (gazda majorității experiențelor cu DNA recombinant) devine competentă pentru a primi DNA din fagii temperați fără folosirea „fagului ajutător”, iar competența dobîndită în urma tratamentului cu ioni de  $\text{Ca}^{2+}$  (ceea ce are ca efect principal mărirea permeabilității peretelui celular al bacteriei) determină mărirea eficienței de pătrundere în celule a moleculelor de DNA, atît liniare cît și circulare.

Odată ce pătrunderea DNA străin în celulele competente a fost facilitată de tratamentul cu ioni de  $\text{Ca}^{2+}$ , o altă problemă care trebuia rezolvată era aceea de a cunoaște dacă prin transformare se poate introduce DNA recombinant în celulele competente și dacă DNA recombinant odată pătruns, se poate exprima biologic în celulele competente. Rezolvînd această problemă, calea unei noi tehnologii prin care se poate insera și exprima DNA de diferite origini (cromozomal sau plasmidic) într-un vehicul adecvat era deschisă. Problema a fost pentru prima dată rezolvată de către Cohen și colab. (1972 și 1973), prin construirea atît *in vivo*, cît și *in vitro* a unor plasmide bacteriene biologic funcționale (active). Plasmidele construite de acești autori (prin scindarea cu endonucleaze restrictive a plasmidelor parentale și legarea fragmentelor cu DNA-ligază) au fost inserate în *E. coli*, iar prin transformare s-au dovedit a fi repliconi activi, posedînd proprietățile genetice și secvența nucleotidelor caracteristică moleculelor de DNA parentale. Aceste experiențe au dovedit că este posibil să se construiască molecule de DNA recombinant prin inserția specifică a fragmentelor de DNA de diferite origini (izolate din cromozomi de procariote sau eucariote, din elemente extracromozomale etc.) în plasmide bacteriene care au proprietatea de a se replica independent. Aceste molecule recombinante sînt biologic active în momentul în care ele sînt introduse în *E. coli* prin transformare.

Prin urmare, prin transformare, moleculele de DNA recombinant pătrund în celulele receptoare. Moleculele de DNA recombinant fiind purtătoare de informație genetică specifică (proprietăți pe care celula receptoare nu le are) vor specifica prin mecanismele expresiei de mesaj proprietăți noi în celula receptoare. Ceea ce este esențial pentru fenomenul de transformare este faptul că proprietățile noi cîștigate în acest mod rămîn stabile de-a lungul generațiilor, oferindu-se astfel posibilitatea multiplicării după dorință a informației genetice noi introduse.



## II.1.8. Clonarea DNA recombinant

Pătrunderea DNA recombinant în celule prin procesul de transformare se face în general cu o eficiență scăzută. De obicei, celulele transformate sînt produse de captarea unei singure molecule de DNA recombinant. Din acest motiv celulele formează cîte o colonie specifică, ce se deosebește de alte colonii generate de alte specii moleculare de DNA. Recunoașterea celulelor transformate de DNA recombinant se bazează în principal pe unele proprietăți ale vehiculului sau, în anumite cazuri, chiar pe cele ale pasagerului.

Vehiculul, de exemplu (posedînd markeri genetici, cum ar fi rezistența la anumite antibiotice), conferă numai celulelor transformate (cele în care a intrat DNA recombinant) posibilitatea să crească în prezența antibioticelor respective. Pe această bază se pot selecționa și clona transformanții obținuți.

Pasagerul poate și el servi la clonarea DNA recombinant. Astfel, introducerea genei  $\beta$ -galactozidazei ca pasager într-un vehicul conferă vehiculului respectiv unele caracteristici proprii acestei enzime. Colonii generate de DNA recombinant conținînd  $\beta$ -galactozidază devin albastre, spre deosebire de celelalte colonii care nu conțin enzima și care sînt albe.

Este suficient să se izoleze o singură colonie pentru a propaga apoi după dorință celulele respective, pentru a produce DNA recombinant sau produsul pe care îl sintetizează acest DNA artificial.

## II.1.9. Identificarea chimică a DNA recombinant

Identificarea celulelor în care se multiplică DNA recombinant este relativ ușoară, deoarece markerii genetici ai vehiculului permit selecționarea celulelor transformate. În schimb, identificarea pasagerului legat de vehicul este mai dificilă, deoarece — așa cum s-a menționat — numai în unele cazuri, cum este cel al  $\beta$ -galactozidazei, pasagerul posedă markeri ușor detectabili. Totuși, există unele metode puse la punct în acest scop; amintim două din cele mai des folosite.

**II.1.9.1. Metoda hibridizării „in situ”.** Este metoda cea mai simplă de identificare a DNA recombinant. Ea are particularitatea principală de a permite detectarea secvențelor specifice ale nucleotidelor pasagerului în celulele unei colonii, fără a necesita izolarea DNA din celule; coloniile se imobilizează pe discuri de nitroceluloză, pe care se efectuează apoi testul de hibridizare cu DNA sau RNA radioactiv complementar (Grunstein și Hogness, 1975).

**II.1.9.2. Excizia pasagerului din vehicul și analiza secvenței bazelor sale.** Această metodă este foarte laborioasă, dar are avantajul că oferă rezultate care permit compararea riguroasă a secvenței nucleotidelor pasagerului excizat cu aceea a secvenței nucleotidelor pasagerului înainte de inserție. La excizia pasagerului din vehicul se ține seama de modul în care el a fost inserat în DNA recombinant, pentru a folosi, pe cât posibil la excizie, calea inversă parcursă la inserție. De regulă se face uz de aceleași enzime de restricție care au fost folosite și la introducerea pasagerului în vehicul. O metodă de excizie a pasagerului este redată la pag. 210. După excizia pasagerului urmează analiza secvenței nucleotidelor sale, ceea ce azi se realizează destul de ușor prin tehnica lui Maxam și Gilbert (1977). Odată ce identitatea celor două secvențe este dovedită prin această metodă, nu mai există nici un dubiu în legătură cu identitatea pasagerului.

## II.1.10. Identificarea produsului sintetizat de DNA recombinant

Construcția unui DNA recombinant se face atât în scopuri academice — pentru studiul unor gene, dar mai ales în scopuri practice — pentru a realiza pe cale biologică sinteza avantajoasă a unui anumit produs (proteină, enzimă, hormon etc.) necesar în industrie, medicină sau alimentație. Prin urmare, scopul cercetărilor cu DNA recombinant este atins doar în momentul în care produsul rezultat din această tehnologie este identificabil sau se poate obține în cantitate mai mare și mai economic decât pe cale obișnuită.

Identificarea și analiza produsului sintetizat de DNA recombinant este deci deosebit de importantă, deoarece numai pe baza lor se poate stabili succesul sau insuccesul tehnologiei.

Metodele de identificare folosite sînt în general foarte sensibile și specifice. Identificarea somatostatinei produsă de gena somatostatinei sintetizată chimic (Itakura și colab. 1977) sau a antigenelor specifice virusului hepatitei *B* produse de DNA recombinant conținînd gena hepatitei *B* (Burrell și colab., 1979) s-a făcut cu ajutorul metodei radioimunologice (RIA), cea mai sensibilă metodă existentă pentru dozarea acestor componente. Prin această metodă s-a stabilit că în unele cazuri celulele de *E. coli* purtătoare a DNA recombinant, conținînd gena somatostatinei, conțin 0,3% somatostatină din cantitatea totală de proteină. Etapele principale ale tehnologiei DNA recombinant sînt redată schematic în fig. 7.

După cum se vede în figură prima etapă constă în alegerea și izolarea vehiculului și a pasagerului. Urmează apoi deschiderea vehiculului circular cu o enzimă de restricție. Dacă pasagerul a fost izolat cu aceeași enzimă de restricție atunci capetele vehiculului și ale pasagerului devin coezive, ceea ce permite atașarea perfectă a pasagerului de vehicul.



Legarea covalentă a pasagerului de vehicul se face cu DNA ligază. În urma acestui tratament rezultă un DNA recombinant care este de fapt o moleculă de DNA compusă din două fragmente de DNA (provenite din specii biologice diferite sau chiar din aceeași specie biologică), cu elementele lor genetice aranjate în mod artificial și neîntâlnite în

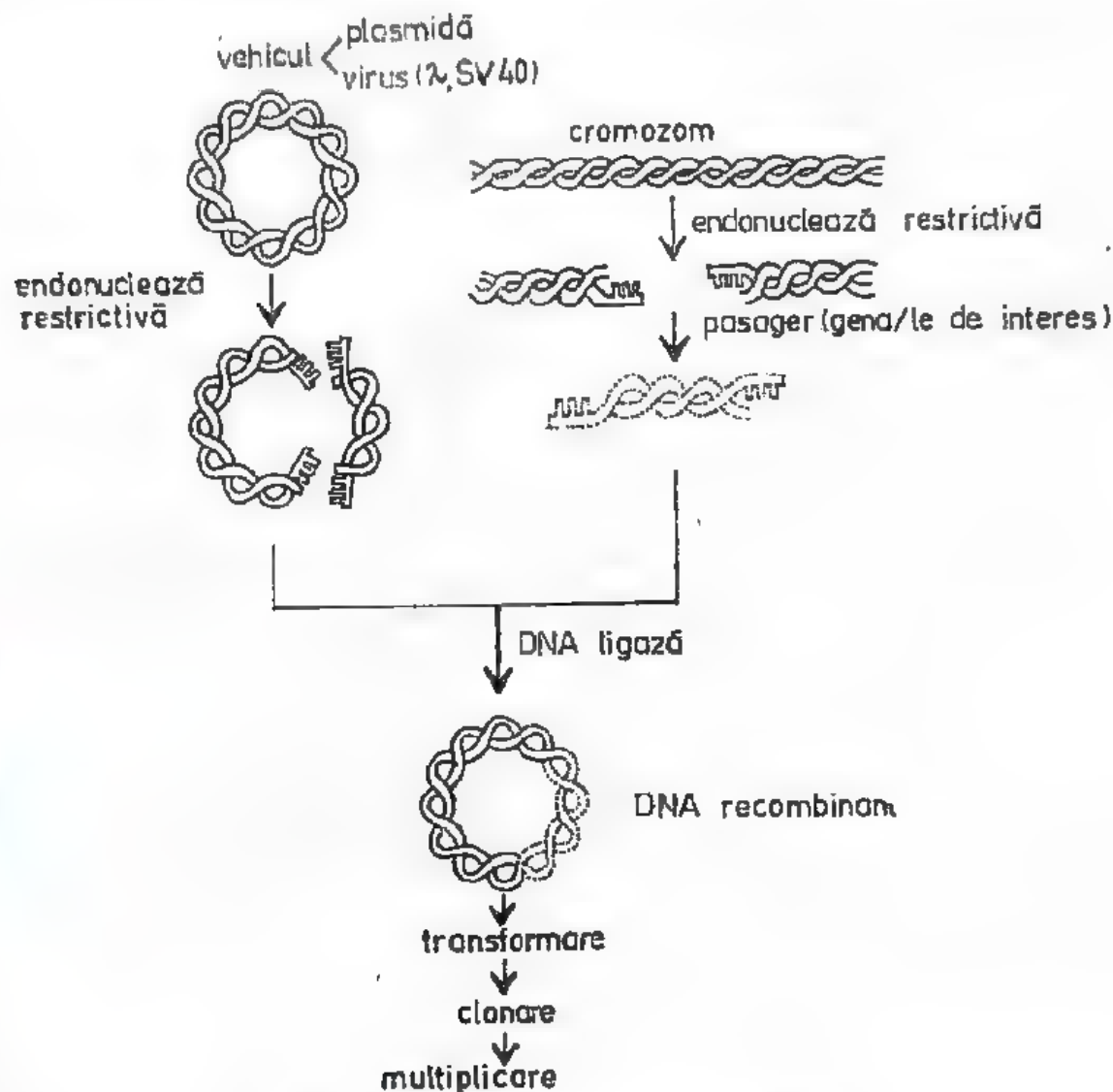


Fig. 7. Tehnologia DNA recombinant.

natură. Pasagerul atașat de vehicul se comportă pasiv; el ajunge sub controlul vehiculului care îl multiplică odată cu multiplicarea sa. Introducerea DNA recombinant în celula-gazdă se face prin transformare. Celulele în care a pătruns DNA recombinant se transformă și dobîndesc proprietăți genetice noi. Coloniile pe care le formează aceste celule sînt recunoscute după proprietățile vehiculului, iar în unele cazuri, după cele ale pasagerului. Fiecare colonie poate fi multiplicată pentru a obține cantitatea dorită de DNA recombinant sau, pe această cale, a produsului biologic a cărui sinteză este dirijată de el.

## Bibliografie

1. Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M., *J. Exp. Med.*, **79**, 137 (1944).
2. Burrell, C.J., Mackay, P., Greenaway, P.J., Schneider, P.H., Murray, K., *Nature*, **279**, 43 (1979).
3. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)*, **62**, 2110 (1972).
4. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Helling, R.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)*, **70**, 3240 (1973).
5. Abelson, J., *Science*, **196**, 159 (1977).
6. Arber, W., *TIBS*, Aug. (1977).
7. Griffith, F., *J. Hyg.*, **27**, 113 (1928).
8. Grunstein, M.C., Hogness, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)*, **72**, 3961 (1975).
9. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
10. Jacob, F., Brenner, S., Cusin, F., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **28**, 329 (1963).
11. Mandel, M., *Mol. Gen. Genetics*, **99**, 88 (1967).
12. Mandel, M., Higa, A., *J. Mol. Biol.*, **53**, 159 (1970).
3. Maxam, M., Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)*, **74**, 560 (1977).



### III. Fenomenul de restricție și modificare

Tehnologia DNA recombinant s-a putut dezvolta în mare măsură datorită descoperirii de către microbiologi a fenomenelor de *restricție* și *modificare*. Studiile sistematice ale acestui fenomen au permis apoi biochimistilor să izoleze și să caracterizeze enzimele specifice de restricție și de modificare, acele „bisturie” indispensabile în scindarea controlată a materialului genetic, necesară în cercetările de inginerie genetică. S-a considerat deci util ca, înainte de a descrie enzimele de restricție și de modificare, să fie prezentate câteva informații despre fenomenul de restricție și de modificare.

Primele observații privind activitatea de restricție (*R*) și de modificare (*M*) sau, pe scurt, sistemul *R—M* al celulelor bacteriene au fost făcute de către Luria și Human (1952) și Bertani și Weigle (1953). Studiind capacitatea unor bacteriofagi de a infecta anumite tulpini bacteriene, aceștia au constatat că eficiența infecției depinde de tulpina de bacterie pe care a fost cultivat bacteriofagul ultima oară. În cursul studierii specificității de gazdă a virusurilor bacteriene, s-a observat că la schimbarea gazdelor aceste virusuri se multiplică greu la început, dar apoi se adaptează noilor gazde și cresc neinhibate. Această adaptare — așa-numita *modificare controlată de gazdă* — nu este stabilă din punct de vedere genetic, adică nu implică selecția unui mutant capabil să reproducă infecția. Dimpotrivă, modificarea specifică a virusului se pierde la creșterea pe o altă gazdă, astfel încât la reinfectarea primei gazde numai o mică parte din particulele virale va continua să se multiplice. Fenomenul acesta de întârziere a creșterii virusului pe noua gazdă se numește *restricție*. Cunoștințele actuale despre restricție și modificare se datoresc însă în principal cercetărilor sistematice efectuate de către Arber și colaboratorii săi.

Astfel, Dussoix și Arber (1962), infectând bacteria *E. coli* cu <sup>32</sup>P-DNA izolat din bacteriofagul λ nemodificat, au observat că acesta este extensiv scindat în câteva minute după penetrarea lui în celulă.

Analiza  $^{32}\text{P}$ -DNA introdus în sistemul celular a arătat că acesta a fost convertit în fragmente de DNA acido-insolubile, oligonucleotide și fosfor anorganic. În urma acestei infecții abortive celulele au supraviețuit. Mai mult chiar, s-a constatat că o parte din produsele de fragmentare a DNA fagic a fost metabolizată de celula-gazdă, iar o altă parte a fost eliminată în mediu.

Deși restricția — așa după cum se va arăta mai departe — este consecința activității unor enzime specifice (de restricție), care realizează numai un număr limitat de fragmentări a DNA nemodificat, în cursul procesului se produce și o degradare a DNA până la produși acido-solubili. Pentru acest motiv se consideră că activitatea de restricție se realizează de fapt în două etape principale.

Prima etapă este caracterizată de fragmentarea foarte specifică a DNA nemodificat într-un număr limitat de fragmente, prin ruperea ambelor catene ale dublei elice a DNA. Acest proces este realizat de o enzimă de restricție (Meselson și Yuan, 1968). A doua etapă este mai lentă. În cursul ei se produce digestia nespecifică a DNA de către endonucleaze nespecifice.

Figura 8 explică, printr-un exemplu, restricția și modificarea virurilor bacteriene, fenomene controlate de gazdă.

Cele două tulpini de *E. coli*, *K* și *C*, sînt gazde naturale ale bacteriofagului  $\lambda$ . Cîtă vreme bacteriofagul  $\lambda$  este cultivat pe aceeași gazdă, în condiții optime, fiecare particulă virală produce prin infecție progeni virali (probabilitatea de formare a plajelor este considerată a fi 1). La schimbarea gazdei se observă următoarele: bacteriofagul  $\lambda.C$ , care a crescut pe tulpina *C*, va crește pe tulpina *K* cu o probabilitate de numai  $10^{-3}$ . Noile particule virale formate vor fi  $\lambda.K$  și vor cultiva bine

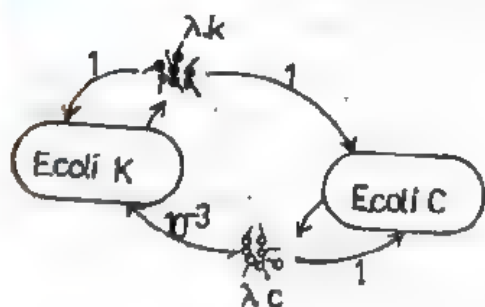


Fig. 8. Exemplu de sistem *R—M* (după Arber, 1977)

pe această nouă gazdă. Pe de altă parte,  $\lambda.K$  crește de asemenea pe tulpina *C*, dar noii progeni virali devin  $\lambda.C$ , nemaifiind capabili să infecteze tulpina *K*. În exemplul de mai sus, tulpina *K* — dar nu și tulpina *C* — are un sistem de restricție și modificare *R—M*. Tulpina *C* acceptă toate virusurile  $\lambda$ , indiferent pe care gazdă au fost crescute anterior. Tulpina *K* acceptă total doar acele virusuri care au fost pasate anterior pe tulpina *K*, suferind modificarea adecvată. Tulpina *K* modifică cel mult  $10/100$  din virusurile crescute pe *C*.



Procesele moleculare responsabile pentru fenomenele de restricție și modificare au fost elucidate la începutul anilor '60, arătându-se că ambele au loc la nivelul DNA, adică la nivelul materialului genetic (Arber și Dussoix, 1962; Dussoix și Arber, 1962). Faptul a fost cu atât mai surprinzător, cu cât se știa că modificarea nu putea fi moștenită. Pentru înțelegerea cât mai deplină a fenomenelor au avut importanță următoarele constatări:

— în situația *R* (de exemplu, infecția tulpinii *K* de *E. coli* cu bacteriofagul  $\lambda.C$  – fig. 7), DNA fagic este rapid degradat de către celula-gazdă, care astfel supraviețuiește infecției; aceasta înseamnă că materialul genetic străin celulei a fost distrus în cursul restricției. Pe de altă parte, dacă bacteriofagul  $\lambda.K$  este lăsat să se multiplice într-o tulpină nerestrictivă doar în cursul unui singur ciclu, atunci singurii progeni care au prezentat o modificare specifică de tip *K* (adică au fost capabili de infectarea neînhibată a tulpinii *K*) au fost cei în care una dintre catenele DNA progen a provenit de la parental, în cursul replicării semiconservative. Acest fapt arată că în tulpina *K* modificarea acționează direct asupra DNA, fără a împiedica replicarea sa corectă ulterioară și că, mai mult, în cursul replicării principiul modificării rămâne asociat cu catena DNA parental;

— s-a arătat că modificarea se datorează metilării nucleotidelor (Arber, 1965; Kühnlein și Arber, 1972; Smith și colab., 1972); în exemplul de mai sus, discutat aici, al tulpinii *K* (fig. 7), unele resturi de adenină — din secvența nucleotidică specifică pentru o anumită enzimă de restricție — sînt metilate, cu formare de  $N_6$ -metiladenină. Această metilare nu modifică conținutul de informație genetică a acidului nucleic și are ca unic rol protecția DNA contra acțiunii endonucleazelor restrictive specifice ale tulpinii *K*.

Pînă în momentul descoperirii și elucidării fenomenului de restricție s-au descris numeroase activități enzimactice care aveau drept țintă DNA, dar corelația acestora cu funcția lor *in vivo* nu a corespuns întotdeauna ca specificitate cu reacția observată *in situ*. O situație cu totul particulară o prezintă, din acest punct de vedere, restricția DNA. Această activitate este realizată de către enzime specifice, denumite *enzime de restricție*, de la fenomenul pe care îl controlează. Ele sînt singurele enzime endonucleolitice a căror activitate *in situ* reflectă atât ca specificitate, cât și ca mărime, activitatea lor *in vivo* (Arber și Linn, 1969). Prin urmare, cînd o bacterie este invadată de un virus necunoscut de ea (nemodificat), se va apăra împotriva acestuia cu ajutorul enzimelor sale de restricție, care au rolul de a scinda molecula de DNA viral, pe care astfel o inactivează. În acest caz se spune că virusul a suferit un proces de restricție.

S-a observat însă că, după unul sau mai multe pasaje ale virusului pe aceeași gazdă bacteriană, un număr mic de particule virale „scapă” procesului de restricție. Mai mult chiar, studiul acestor particule a scos

În evidență că ele se pot multiplica cu mare eficiență, fără să mai sufere procesul de restricție. Această multiplicare a devenit posibilă deoarece virusul s-a „modificat” în contact cu noua gazdă. În ce constă însă modificarea? Analiza mecanismului molecular de modificare a bacteriofagului (virusului) a arătat că acest fenomen este controlat de celula-gazdă și constă de fapt în metilarea enzimatică a DNA viral. S-a constatat că activitatea de modificare — metilare enzimatică în locuri specifice ale moleculei de DNA — este primul caz de metilare a DNA cu funcție cunoscută și că prin aceasta dispunem de un instrument foarte prețios de marcarea a DNA într-o manieră controlabilă, fără a afecta cu nimic mesajul lui genetic (Terzi și Levintal, 1963).

O serie de autori, printre care Gough și Lederberg (1966) și Mamelak și Boyer (1970), au arătat însă că nu toate bazele metilate din DNA și nu toate metilazele din bacterii sînt implicate în procesul de modificare controlată de gazdă.

Activitatea de restricție nu poate fi disociată de activitatea de modificare. Exprimarea proprietăților mai multor tulpini bacteriene (mai ales de *E. coli*) a arătat că fiecare tulpină bacteriană este purtătoarea unui set de activități de restricție și de modificare, iar genele care codifică producerea lor se localizează pe cromozomul bacterian (Arber și Linn, 1969). Cu alte cuvinte, determinanții genetici pentru producerea activităților de restricție și de modificare se găsesc în celulele-gazdă. Acest fenomen a fost pus în evidență, în special, în celulele de *E. coli* K12 și B (Arber și Linn, 1969), dar și în celulele de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, precum și în alte bacterii (Meselson și colab., 1972). Nu se știe dacă sisteme asemănătoare există și în organisme superioare. Important este însă că endonucleazele restrictive bacteriene pot scinda DNA din virusuri animale și chiar din celule animale, fapt dovedit pentru prima oară de către Danna și Nathans (1971), ceea ce a permis utilizarea enzimelor bacteriene pentru a produce rupeți specifice în moleculele de DNA de origine animală, atît în scopul cartării cromozomilor, cît și pentru folosirea fragmentelor de DNA pentru cercetările de inginerie genetică.

### III.1. Caracteristicile generale ale sistemului de restricție și modificare

După Bertani și Weigle (1953) și Meselson și colab. (1972), sistemele de restricție și modificare prezintă următoarele caracteristici generale:

— bacteria poate avea una sau mai multe specificități de restricție și modificare, determinate genetic. Astfel, DNA care pătrunde într-o celulă avînd specificitatea de restricție  $r_1$  va fi degradat dacă derivă din celule lipsite de specificitatea de modificare de tip  $m_1$ ;



— tulpini bacteriene cu o specificitate de restricție  $r_1$  au în mod obligatoriu o specificitate de modificare  $m_1$ . Această condiție este întotdeauna respectată, pentru că ea determină protecția DNA propriu celulelor față de sistemul celular de restricție respectiv. De exemplu, bacteriofagul  $\lambda$  cultivat pe tulpina de *E. coli* K formează eficient plaje

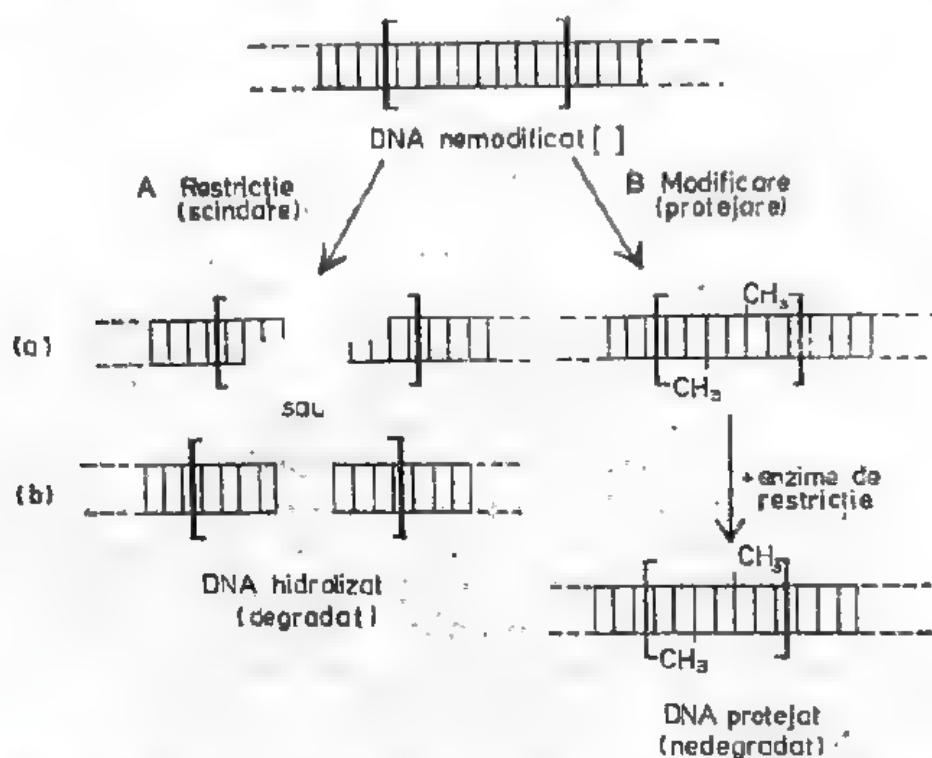


Fig. 9. Schema generală a fenomenului de restricție și modificare.

pe tulpini K, deoarece acestea au specificitățile de restricție și modificare  $r_K$  și respectiv  $m_K$ .

— atunci când o tulpină are mai mult decît un sistem de restricție și modificare, fiecare sistem funcționează independent, după regulile menționate mai sus. Trebuie precizat că există însă și unele tulpini, cum este cazul tulpinii *E. coli* C, care par a fi lipsite de sisteme de restricție și modificare.

În fig. 9 sînt reprezentate schematic cele două fenomene, de restricție și modificare.

### III.2. Rolul biologic major al restricției și modificării

Încă de la începutul studiului fenomenului de restricție și modificare s-a pus întrebarea: care este rolul său biologic? Multiplele rezultate acumulate în urma cercetărilor care s-au făcut asupra acestui fenomen au condus la concluzia principală că restricția și modificarea

controlate de celulele bacteriene ar fi, de fapt, un sistem unic de apărare a celulei față de agenți virali străini. Ca rezultat al acțiunii acestui sistem, un DNA viral străin — intrat în celulă — este specific identificat și apoi inactivat. Mecanismul este extrem de operativ față de un virus străin care a pătruns în mediu și față de care populația bacteriană nu și-a construit încă un echipament de apărare. Deci, rolul major al sistemului de restricție și modificare, existent în celulele bacteriene, ar fi asemănător cu acela al sistemului imunitar cu care sînt înzestrate organismele superioare (Arber și Linn, 1969) și anume apără celulele purtătoare contra infecției cu material genetic străin. DNA celular propriu este apărut de acțiunea enzimelor de restricție prin metilarea de modificare. Fenomenul nu este limitat doar la DNA viral, ci afectează și DNA celular (Arber, 1962; Boyer, 1964; Pittard, 1964).

Trebuie însă precizat că, pînă în prezent, studii sistematice ale sistemului de restricție și modificare s-au făcut pe un număr relativ mic de tulpini bacteriene. De aceea, rămîne încă în domeniul speculativ dacă toate enzimele bacteriene, denumite astăzi „de restricție și modificare”, aparțin de fapt sistemului propriu-zis de restricție și modificare. În lumina acestei precizări, este prematur să acceptăm ca definitivă și generală ideea conform căreia restricția și modificarea ar fi, la toate bacteriile, un sistem imunologic primitiv de apărare. Totuși alte funcțiuni biologice decît cele discutate mai sus, echivalente unui sistem imunologic primitiv, nu au fost identificate pînă în prezent, dar discuțiile nu sînt încă încheiate (Arber, 1977).

Sistemul de restricție și modificare ar putea avea deci și alte roluri importante în menținerea echilibrului ecologic, în care bacteria este confruntată cu diferite condiții de creștere și unde ea trăiește în populații mixte, cu o mare varietate de alte tulpini bacteriene și bacteriofagi. În acest caz, sistemul de restricție și modificare ar funcționa ca un sistem organizat de apărare față de invazia unui DNA străin, iar tulpinile avînd un sistem eficient de restricție ar avea o șansă mai mare de supraviețuire într-o nișă ecologică particulară (Arber, 1977).

Un alt rol posibil al sistemului de restricție și modificare ar fi acela de a oferi semnale specifice pe molecula de DNA necesare replicării sau transcrierii DNA. Întrucît mutanții deficienți în sistemul de restricție și modificare prezintă aceleași caracteristici de creștere ca și tulpinile parentale, rezultă că acest rol este puțin probabil să fie operativ.

În schimb, este mult mai posibil ca sistemul de restricție și modificare să aibă un rol important în procesele de recombinare și reparație. Așa cum se va arăta mai departe, enzimele de restricție sînt utilizate pentru fragmentarea specifică a DNA *in vitro*, pentru a obține apoi molecule de DNA recombinant cu ajutorul DNA ligazei. Or, dacă acest lucru este posibil în eprubetă, se pune întrebarea: de ce nu s-ar produce același proces și în natură? De regulă fragmentarea se produce însă asupra DNA heterolog. În plus, este greu de înțeles de ce celula



ar avea motive să recombine două fragmente de DNA de diferite origini. Cum însă atât recombinația, cât și repararea DNA nu sînt total lămurite, ipoteza rolului sistemului de restricție și modificare în aceste procese nu trebuie totuși abandonată.

Prin urmare, în momentul de față, este greu de dat un singur răspuns clar la întrebarea privind funcția biologică exactă a sistemului de restricție și modificare la bacterii. Ar fi posibil să existe chiar mai multe răspunsuri la această întrebare. După cum precizează Arber (1977) modelul imunologic ar putea fi satisfăcător, cu toate că el are dezavantajul de a nu fi ușor de dovedit.

Pînă în prezent, sistemele  $R-M$  au fost detectate neechivoc doar la bacterii, într-o largă varietate de specii. Studiile sistematice au fost însă restrinse la un număr mic de tulpini: *E. coli* și *Enterobacteriaceae* înrudite, *Bacillus subtilis*, diverse tipuri de *Pseudomonas* și *Haemophilus* (Boyer, 1971; Roberts, 1976).

Informația genetică pentru sistemele  $R-M$  este cel mai adesea stocată în cromozomii bacterieni, dar uneori se poate găsi și în plasmide sau în genomul unor bacteriofagi.

Tulpinile bacteriene sălbatice conțin unul sau mai multe sisteme  $R-M$ , înrudite sau nu; de asemenea, există tulpini în care nu s-au identificat încă astfel de activități enzimatică. Din tulpini conținând sisteme  $R-M$  se pot obține prin mutageneză tulpini noi, lipsite de aceste activități (Glover și colab., 1963; Wood, 1966). În condiții de laborator acești mutanți nu par a fi dezavantajați, comparativ cu paren-talii, dar mai mult ca sigur că lucrurile sînt diferite în sistemele ecologice naturale.

Eficacitatea unui sistem  $R-M$  față de un genom străin depinde de faptul dacă genomul este sau nu sensibil la sistemul considerat; aceasta presupune existența prezenței unor centri specifici de recunoaștere pe molecula de DNA față de un sistem  $R-M$ . În cazul unor molecule mici de DNA (de exemplu, genomul unor bacteriofagi) s-ar putea ca să nu existe nici un centru de recunoaștere sau să existe unul singur. În cazul existenței unui singur centru, sensibilitatea la restricție se poate pierde prin mutația unui singur nucleotid din secvența de recunoaștere (Arber și Kühnlein, 1967). În acest mod se poate face și maparea genetică a centrului de recunoaștere. Dealtfel, din punct de vedere istoric, acest tip de experiment a dus la constatarea centrilor de recunoaștere în reacțiile enzimatică de tip  $R-M$  (Arber și Linn, 1967).

### III.3. Enzime de restricție

Pînă în prezent s-au descris numeroase enzime (peste 150) implicate în fenomenul de restricție și modificare, iar numărul lor este în continuă creștere. În ciuda existenței unui număr așa de mare de enzime de

restricție și modificare, ele pot fi grupate după mecanismul lor de acțiune în fenomenul de restricție (Boyer, 1971) în trei tipuri principale:

a) *enzime de restricție și modificare de tip I sau sisteme enzimatic R—M I*; cuprinde enzimele de restricție care acționează numai în prezența unor cofactori, cum ar fi S-adenozilmetionina (SAM) și acidul adenozintrifosforic (ATP). Aceste enzime au proprietatea de a fragmenta DNA bicatenar într-o anumită secvență de nucleotide, diferită de secvența de nucleotide folosită de enzimă pentru recunoașterea substratului (Meselson și Yuan, 1968; Linn și Arber, 1968);

b) *enzime de restricție și modificare de tip II sau sisteme enzimatic R—M II*; cuprinde enzime care acționează în absență de cofactori (SAM, ATP) și clivează DNA bicatenar în interiorul secvenței nucleotidice de recunoaștere pentru enzimă;

c) *enzime de restricție și modificare de tip III sau sisteme enzimatic R—M de tip III*; foarte recent s-a propus introducerea unui al treilea tip de enzime, care le cuprinde pe acelea a căror activitate este doar stimulată de SAM, fără să aibă neapărată nevoie de prezența lui. Întrucât acest tip enzimatic are un număr restrâns de reprezentanți și caracterizarea lui nu este încă suficientă, se vor prezenta doar câteva date privind caracteristicile sale:

După cum se poate remarca cu ușurință, clasificarea nu ține cont de activitatea de modificare prezentată de sistemele respective. În principal, pentru motivul că activitatea de modificare are la bază unul și același proces chimic de metilare a DNA, promovat de enzimele având această activitate.

Trebuie însă precizat că în sistemul *R—M* de tip I cele două activități pot fi exercitate de aceeași enzimă; ea acționează ca restrictază atunci când are toate subunitățile și se comportă exclusiv ca enzimă de modificare atunci când pierde o anumită subunitate. Situația este total diferită în sistemele *R—M* de tip II, unde cele două activități sînt grefate pe două suporturi proteice diferite.

În general, endonucleazele restrictive — alături de o serie de endonucleaze nespecifice — sînt implicate în scindarea hidrolitică a legăturilor fosfodiesterice din acizii deoxiribonucleici. Conform normelor Comisiei de Enzimologie a Uniunii Internaționale de Biochimie (I.U.B.) esterazele care hidrolizează diesterii fosforici formează sub-subclasa *E.C. 3.1.4.*

În continuare vor fi prezentate câteva date asupra enzimelor de restricție, atît din punct de vedere al structurii, cît și al proprietăților și al mecanismelor de acțiune asupra duplexului de DNA.

Întrucît despre endonucleazele restrictive de tip II se cunosc mai multe date în ceea ce privește mecanismul lor de acțiune, pe de o parte, și deoarece sînt din ce în ce mai mult utilizate în tehnologia DNA recombinant, precum și în determinarea secvențelor de DNA, pe de altă parte, prezentarea va începe cu aceste enzime.



### III.3.1. Sisteme R-M de tip II

Endonucleazele restrictive de tip II au jucat și joacă un rol deosebit în dezvoltarea tehnologiei DNA recombinant, cu toate că dintre numeroasele enzime cunoscute doar două — Eco RI și Hind II — au fost utilizate extensiv; în ultima vreme și alte enzime restrictive și-au găsit locul în arsenalul acestei tehnologii biochimice a viitorului.

**III. 3.1.1. Clasificarea enzimelor de restricție de tip II în funcție de structura centrului de recunoaștere.** Clasificarea enzimelor de restricție de tip II s-a făcut în funcție de numărul de baze care intră în secvența de recunoaștere, reprezentată de un *palindrom*. Se deosebesc trei grupe de enzime de restricție tip II cu patru, cinci și, respectiv șase nucleotide implicate în procesul de recunoaștere (tabelul 1).

În cadrul fiecărei grupe există diferențe între produsele de clivare a duplexului de DNA. Astfel, în grupul de enzime de restricție care recunosc secvențe tetranucleotidice sînt incluse atît enzime care duc la apariția de *capete netede* sau *tocite* (*flush, blunt* sau *smooth ends*) (capete cu secvențe nucleotidice complementare complete; de exemplu, Hae III), cît și enzime care duc la apariția de *capete coezive* sau *lipicioase* (*cohesive ends*) (capete cu secvențe nucleotidice mai lungi în sensul 3', de exemplu Hha I sau în sensul 5', de exemplu Hpa II sau Mbo I). Mai mult chiar, unele enzime, cum ar fi endonucleaza restrictivă *Hinf I*, recunosc o secvență nucleotidică variabilă.

Calculul probabilităților arată o frecvență de apariție întîmplătoare a palindromului tetranucleotidic odată la 256 perechi de baze, ceea ce face ca în urma clivării duplexului de DNA cu enzime de restricție care au în situsul de recunoaștere secvențe tetranucleotidice să apară fragmente moleculare mai mici. Fac excepție de la regulă enzimele Hha I și Hpa II, care rup DNA din celulele eucariote cu o frecvență mult mai mică decît cea calculată, aceasta probabil datorită faptului că DNA din eucariote are o proporție relativ redusă de dinucleotide CG, care se află în centrul de recunoaștere al acestor enzime.

Tot o excepție o constituie și enzima de restricție Dpn I, care recunoaște tetranucleotidul GATC numai dacă este modificat, constituind — pînă în prezent — singura endonuclează restrictivă absolut dependentă de DNA modificat. În același timp se cunoaște și Dpn II, care recunoaște și atacă aceeași secvență ca și Dpn I, dar nemodificată.

Se cunosc deocamdată puține endonucleaze restrictive care să recunoască secvențe pentanucleotidice. Dintre acestea, enzimele Hph I și Mbo II au o comportare puțin mai neobișnuită și anume secvențele pe care le recunosc nu prezintă nici un element de simetrie și, în plus,

ruperea duplexului de DNA are loc la distanță de centrul de recunoaștere, după opt perechi de baze.

Cele mai numeroase enzime de restricție de tip II studiate, recunosc palindroame hexanucleotidice, dar și aici se remarcă o mare varietate, atât în tipul secvenței de recunoaștere, cât și în tipul de „capete” pe care îl produc la hidroliză (netede sau coezive). Astfel, Hpa I „taie” secvența GTT.AAC eliberând capete netede, în timp ce Bam I și Pst I formează capete coezive, cu extensie în sensul 5' și, respectiv 3'. De asemenea, s-a constatat că enzimele provenind din *Haemophilus influenzae* serotip d (Hind II) sau *Haemophilus aegyptius* (Hae I, Hae II) nu reclamă o specificitate absolută a bazelor din secvențele lor de recunoaștere, putând deci ataca câteva secvențe hexanucleotidice diferite în zona lor centrală, dar identice în zonele lor periferice.

Analizând tabelul 1 se poate constata că există numeroase asemănări între secvențele atacate de enzime care recunosc situsuri tetranucleotidice și cele care recunosc situsuri hexanucleotidice. De exemplu, Mbo I recunoaște secvența . GATC, în timp ce specificitatea Bam I și Bgl I merge mai departe, ele recunoscând secvențele hexanucleotidice G.GATCC și, respectiv A.GATCT. Același paralelism se poate observa și între Hae III (GG. CC) și Bal I (TGG. CCA) sau între Alu I (AG.CT) și Hind III (A.AGCTT). Pentru aceste enzime Roberts a introdus termenul de *izoschizomeri*.

Tabelul 1

Endonucleaze\* specifice și secvențele lor de recunoaștere (după Roberts, 1977)

Tetranucleotide		Pentanucleotide	Hexanucleotide	
Alu I	A G. C T	Eco RII .C C( <sup>A</sup> / <sub>T</sub> )G G	Ava I	C. Py C G Pu G
	T C. G A	G G ( <sup>T</sup> / <sub>A</sub> ) C C		G Pu G C Py. C
Hae III	G G. C C	Hph I G G T G A	Bam I	G. G A T C C
	C C. G G	C C A C T→		C C T A G. G
		→8 perechi baze		
Hha I	G C G. C	Mbo II G A A G A	Bgl II	A. G A T C T
	C. G C G	C T T C T→		T C T A G. A
		→8 perechi baze		
Hpa II	C. C G G		Bal I	T G G. C C A
	G G C. C			A C C. G G T
Mbo I	.G A T C		Eco RI	G. A A T T C
	C T A G.			C T T A A. G
Taq I	T. C G A		Hind III	A. A G C T T
	A G C. T			T T C G A. A
Hinf I	G. A(N) T C		Hpa I	G T T. A A C
	C T(N) A. G			C A A. T T G



Tabelul 1 (continuare)

Tetranucleotide		Pentanucleotide	Hexanucleotide	
Dpn I	.G A T C C T A G. (numai modificat)		Pst I	C T G C A. G G. A C G T C
Dpn II	.G A T C C T A G.		Xma I	C. C C G G G G G G C C. C
			Hae I	(A) G G. C C(A) (T) (T) C C. G G(A) (A)
			Hae II	Pu G C G C. Py Py. C G C G Pu
			Hind II	G T Py. Pu A C C T Pu. Py T G

\* Denumirile au fost propuse de către Smith și Nathans (1973); enzimele de restricție sînt desemnate prin prima literă a denumirii genului bacteriei, urmată de primele două litere ale denumirii speciei. Celelalte litere sau cifre indică fie tulpina din care s-a izolat enzima, fie ordinea descoperirii mai multor activități în aceeași tulpină.

<sup>1</sup> Punctul indică locul ruperii duplexului polinucleotidic. Alu I din *Arthrobacter luteus* (Roberts și colab., 1976b); Hae I, Hae II, Hae III din *Haemophilus aegyptius* (Middleton și colab., 1972; Roberts și colab., 1975); Hha I din *Haemophilus haemolyticus* (Roberts și colab., 1976a); Hpa I, Hpa II din *Haemophilus parainfluenzae* (Garfin și Goodman, 1974; Sharp și colab., 1973); Mbo I, Mbo II din *Moraxella bovis*; Taq I din *Thermus aquaticus*; Hinf I, din *Haemophilus influenzae* serotip f; Dpn I, Dpn II din *Diplococcus pneumoniae* (Lacks și Greenberg, 1973); Eco RI, Eco RII din *Escherichia coli* (Bigger și colab., 1973; Boyer și colab., 1973; Greene și colab., 1976; Hedgpeth și colab., 1972); Hph I din *Haemophilus parahaemolyticus* (Kleid și colab., 1976); Ava I din *Anabaena variabilis* (Murray și colab., 1976); Bam I din *Bacillus amyloliquefaciens* H (Wilson și Young, 1975); Bgl II din *Bacillus globigii*; Bal I din *Brevibacterium albidum*; Hind II, Hind III din *Haemophilus influenzae* serotip d (Kelly și Smith, 1970; Old și colab., 1975; Smith și Wilcox, 1970); Pst I din *Providencia stuartii* (Smith și colab., 1976; Brown și Smith, 1976); Xma I din *Xanthomonas malvacearum*.

N (din secvența pentru Hinf I) poate fi orice nucleotid.

Au mai fost caracterizate și alte endonucleaze specifice, cu toate că secvențele lor de recunoaștere nu au fost încă stabilite (tabelul 2).

Aceste enzime au fost studiate deoarece se găsesc în cantități destul de mari în celulele bacteriene și, în plus, s-au putut purifica cu destulă ușurință. Astfel, de exemplu, Mnl I care recunoaște probabil un tetranucleotid produce ruperea DNA din SV40 sau din bacteriofagul ØX174 în numeroase fragmente. Numărul mare de fragmente pe care îl dă la ruperea DNA din bacteriofagul λ sau din adenovirusul 2 enzima Hga I sugerează că ea are un situs de recunoaștere tetra- sau pentanucleotidic. Hga I nu reușește să cliveze DNA din SV40, probabil deoarece

Tabelul 2

## Endonucleaze specifice parțial caracterizate (după Roberts, 1977)

Enzima	Proveniența	Frecvența de rupere a DNA		
		$\lambda$ (50 000 pe- rechi baze)	Ad-2 (38 000 pe- rechi baze)	SV40 (5 000 pe- rechi baze)
Bgl I	<i>Bacillus globigii</i>	22	12	1
Blu I	<i>Brevibacterium luteum</i>	1	7	0
Hga I	<i>Haemophilus gallinarum</i>	>30	>30	0
Kpn I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	8	1
Mnl I	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	>50	>50	>10
Sac I	<i>Streptomyces achromogenes</i>	2	>7	0
Sac II	<i>Streptomyces achromogenes</i>	3	>20	0
Sal I	<i>Streptomyces albus</i> G	2	3	0
Xba I	<i>Xanthomonas badrii</i>	1	4	0

enzima ar necesita în centrul de recunoaștere prezența dinucleotidului CG, rar întâlnit în DNA din eucariote, iar DNA de SV40 se comportă, din acest punct de vedere, ca DNA din eucariote.

DNA din adenovirusul de tip 2 sau din bacteriofagul  $\lambda$  mai sînt hidrolizați în numeroase fragmente și de către alte enzime de restricție, cum ar fi Hpa II, Hha I, Taq I, la care s-a dovedit deja existența secvenței tetranucleotidice la situsul de recunoaștere.

Despre celelalte endonucleaze specifice se știu relativ puține lucruri. De exemplu, s-a stabilit că Sal I, la fel ca și numeroase alte enzime de restricție, produce capete coezive (tabelul 3), dar nu se cunoaște nici secvența, nici extensia lor.

Tabelul 3

## Enzime care formează capete coezive (după Roberts, 1977)

Enzima	Secvența	Enzima	Secvența
Bam I	G. G A T C C	Hpa II	C. C G G
Bgl II	C C T A G. G	Pst I	G G C. C
Eco RI	A. G A T C T	Taq I	C T G C A. G
Eco RII	T C T A G. A	Xma I	G. A C G T C
	G. A A T T C		T. C G A
	C T T A A. G		A G C. T
	C C (A) G G		C. C C G G G
	G G (T) C C.		G G G C C. C
		Sal I	?



Tabelul 3 (continuare)

Enzima	Secvența	Enzima	Secvența
Hae II	Pu G C G C. Py Py. C G C G Pu	Mbo I	.G A T C C T A G.
Hha I	G C G. C C. G C G	Eco RI* <sup>1</sup>	.A A T T T T A A.
Hind III	A. A G C T T T T C G A. A	Hinf I	G. A (N) T C C T (N)A.G

<sup>1</sup> Eco RI\* constituie o variantă defectivă a Eco RI, care se pune în evidență atunci când se lucrează în condiții anormale de pH și de tărie ionică (Polisky și colab., 1975).

Din numărul mare de endonucleaze de restricție de tip II izolate, unele au fost mai bine caracterizate, în sensul că au fost descifrate atât palindroamele din situsul de recunoaștere, cât și numărul de fragmente nucleotidice formate prin acțiunea acestor enzime asupra anumitor specii de DNA, folosite ca substrat (tabelul 4).

Tabelul 4

Caracterizarea unor endonucleaze de restricție (după Tiollais și Rambach, 1977)

Proveniență	Denumire enzimă	Secvență de recunoaștere	Extremități produse	Număr tăieturi DNA		
				λ	Ad-2	SV40
<i>E. coli</i> RY13 (cu plasmida RTF1)	Eco RI	5'-GAATTC- -CTTAAG-3'	5'pAATTC- G-	5	5	1
<i>E. coli</i> R245	Eco RII	-CC (A T) GG- -GG (A T) CC-	pCCTGG- sau- pCCAGG-	35	35	16
<i>Haemophilus influenzae</i> (serotip d)	Hind II	-GTPyPuAC- -CAPuPyTG-	pPuAC- PyTG-	34	20	7
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hind III	-AAGCTT- -TTCGAA-	pAGCTT- A-	6	11	6
	Hpa I	-GTTAAC- -CAATTG-	pAAC- TTG-	11	6	4
	Hpa II	-CCGG- -GGCC-	pCGG- C-	>30	>30	1
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	-GGCC- -CCGG-	pCC- GG-	>30	>30	18
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Bam I	-GGATCC- -CTAGG-	pGATCC- G-	5	3	1
<i>Bacillus globigii</i>	Bgl II	-AGATCT- -TCTAGA-	pGATCT- A-	5	10	—
<i>Serratia marcescens</i> S	Sma I	-CCCGGG- -GGGCCC-	pGGG- CCC-	3	12	—
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	Xma I	-CCCGGG- -GGGCCC-	pCCGGG- C-	3	12	—

Se constată că unele tulpini bacteriene conțin două endonucleaze, de exemplu *Hind* II și *Hind* III din *Haemophilus influenzae* serotip *d*, cu specificitate diferită, în timp ce unele enzime extrase din bacterii diferite au aceeași specificitate a centrului de recunoaștere și dau și aceeași tăietură (*Bam* I și *Bst* I din *Bacillus stearothermophilus*). Endonucleazele de restricție *Sma* I și *Xma* I recunosc același centru, dar clivează palindromul în mod diferit, formând capete netede și, respectiv capete coezive, pe când *Bam* I și *Bgl* I recunosc centri diferiți, dar dau aceeași tăietură.

III.3.1.2. Determinarea secvenței nucleotidice din DNA în situsul de recunoaștere al endonucleazelor de restricție. Pentru înțelegerea mecanismului fenomenului de restricție și pentru a putea utiliza acest fenomen în funcție de necesitățile tehnologiei DNA recombinant, o importanță deosebită o prezintă cunoașterea secvențelor specifice pentru diferite endonucleaze de restricție. De obicei, descifrarea secvențelor implicate în procesul de restricție determinat de enzimele de tip II se face după următoarea schemă generală: capătul 5'-fosforil al produselor de hidroliză se marchează cu  $^{32}\text{P}$  cu ajutorul polinucleotidkinazei (Weiss și Richardson, 1967), iar apoi produșii se analizează prin procedee cromatografice și electroforetice. Prin analiza „celui mai apropiat vecin” (*nearest neighbour*) se deduce apoi secvența nucleotidică terminală. În ceea ce privește capătul 3'-hidroxil al fragmentelor rezultate prin restricție, cu mici excepții — de exemplu pentru enzima *Hind* II (Kelly și Smith, 1970) — nu li s-a determinat secvența.

În continuare se prezintă modul în care Kelly și Smith (1970) au realizat descifrarea secvenței situsului de recunoaștere și de rupere în cazul particular al endonucleazei de restricție *Hind* II.

A. Determinarea secvenței nucleotidice la capătul 5'. Pentru determinarea secvenței nucleotidice la capătul 5'-terminal rezultat după hidroliza DNA din fagul *T7* cu enzima de restricție *Hind* II s-a procedat după cum urmează: DNA fagic s-a marcat uniform cu  $^{33}\text{P}$  și s-a supus acțiunii de restricție a enzimei *Hind* II. Grupările 5'-fosforil apărute în urma hidrolizei au fost îndepărtate prin tratare cu o altă enzimă și anume cu fosfatază alcalină. La capetele 5'-terminale defosforilate au fost transferate cu ajutorul polinucleotidkinazei grupări  $^{32}\text{P}$ -fosforil din  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ . Noile produse, dublu marcate cu  $^{33}\text{P}$  și  $^{32}\text{P}$ , au fost hidrolizate cu diverse nucleaze, iar fragmentele  $^{32}\text{P}$ -marcate izolate prin diverse procedee au fost caracterizate prin electroforeză, cromatografie pe DEAE-celuloză și prin alte metode. În acest mod,



pentru enzima de restricție *Hind* II s-a stabilit existența la capătul 5'-fosfat a unei secvențe pPupApC (fig. 10).

B. *Determinarea secvenței nucleotidice la capătul 3'*. Și pentru determinarea secvenței 3'-terminale, DNA din bacteriofagul T7 uniform

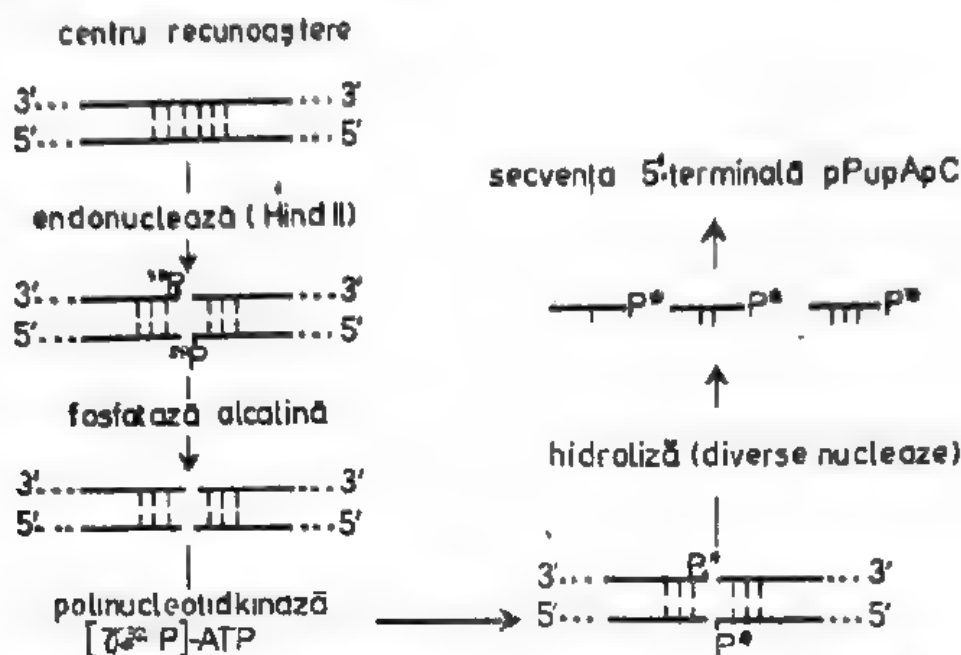


Fig. 10. Etapele principale ale determinării secvenței nucleotidice la capătul 5' (după Kelly și Smith, 1970).

marcat cu  $^{32}\text{P}$  a fost hidrolizat cu endonucleaza de restricție *Hind* II. Produsele rezultate la această primă scindare s-au incubat în continuare cu nucleaza din *Micrococcus lysodeicticus*; după hidroliză s-au format grupări terminale 3'-fosforil și 5'-hidroxil. În aceste condiții, circa 50% din DNA inițial se rupe la nucleozid-3'-fosfați și dinucleozid-3'-fosfați. Capetele 5'-terminale ale DNA vor forma compuși de tip pXp și pXpYp, iar cele 3'-terminale formează compuși XpX și nucleozide. După cromatografie pe DEAE-celuloză, dinucleozidmonofosfații s-au separat prin electroforeză, iar speciile rezultate au fost analizate în continuare prin hidroliză cu fosfodiesteraza din veninul de șarpe, comparativ cu fosfodiesteraza din splină. În acest mod, s-a determinat secvența de la capătul 3'-terminal și anume GpTpPy.

S-au imaginat trei cazuri posibile de aranjare reciprocă a celor două secvențe trinucleotidice determinate (fig. 11).

Rezultatele obținute erau de așteptat pentru cazul a). Deci secvența nucleotidică a centrului de recunoaștere al enzimei de restricție *Hind* II conține șase perechi de baze și anume:



Prin metode similare s-au stabilit și secvențele nucleotidice din situsul de recunoaștere al altor enzime de restricție.

III.3.1.3. Demonstrarea identității secvenței de recunoaștere, clivare și modificare pentru sistemele *R—M* de tip II. Anterior s-a arătat că

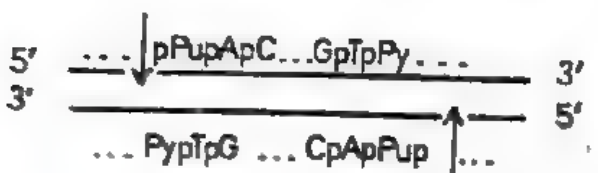
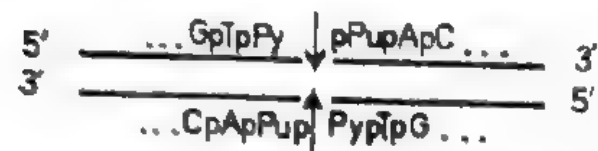
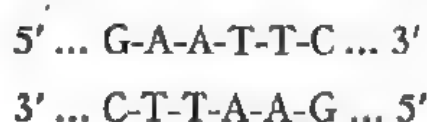


Fig. 11. Posibilitățile de aranjare reciprocă a secvențelor trinucleotidice 3'— și 5'—terminale în cadrul situsului de recunoaștere pentru enzima de restricție *Hind* II: a) clivare cu capete netede; b) și c) clivare cu capete oarecare (după *Kelly și Smith, 1970*).

endonucleaza de restricție *Eco* RI recunoaște și taie următoarea secvență hexanucleotidică din duplexul de DNA:



Or, aceeași secvență o recunoaște și metilaza de modificare corespunzătoare, după cum au demonstrat Dugaiczky și colab. (1974), printr-un experiment de mare eleganță, pe care îl redăm în continuare. Ca substrat s-a utilizat DNA de SV40, care prezintă o moleculă circulară covalentă închisă (*CCI*), cu un singur situs de recunoaștere pentru endonucleaza de restricție *Eco* RI. Prin acțiunea enzimei asupra acestui DNA a rezultat — datorită unei singure rupei — forma liniară a DNA. Molecula liniară rezultată a fost recircularizată cu ajutorul polinucleotidligazei, iar *CCI* astfel obținut a fost metilat. Supus acțiunii *Eco* RI, DNA metilat nu a mai putut fi scindat de către enzima de restricție dovedindu-se că — odată ce molecula a fost modificată prin metilare — activitatea de restricție nu mai poate avea loc, deoarece metilarea s-a produs tocmai în secvența polinucleotidică de recunoaștere.

În prima etapă, DNA-SV40 *CCI* a fost hidrolizat sub acțiunea endonucleazei de restricție *Eco* RI la forma liniară. Grupările 5'-fosfat terminale ale celor două catene ale formei liniare au fost înlocuite cu 5'-<sup>32</sup>P-fosfat, în prezența polinucleotidkinazei și a fosfatazei alcaline. În acest fel s-a marcat situsul de acțiune a endonucleazei de restricție *Eco* RI.



Moleculele de DNA astfel marcate au fost mai întâi încălzite pentru „topirea” duplexului de DNA (adică pentru desfacerea legăturilor de hidrogen dintre cele două catene), iar apoi preparatul a fost răcit brusc, pentru a provoca o renaturare parțială. În etapa următoare, concatermerii rezultați au fost recircularizați cu ajutorul polinucleotidligazei. În timp ce forma liniară a DNA SV40 nu constituie substrat pentru enzima de restricție Eco RI, forma CCI — refăcută în urma tratamentului cu ligază — redevine susceptibilă la scindarea restrictivă.

În continuare s-a procedat la metilarea specifică a DNA CCI cu enzima de modificare corespunzătoare, folosind  $^3\text{H}$ -metil-SAM ca donor de grupări metil. Rezultatul a fost obținerea unui DNA CCI metilat, care s-a dovedit a fi rezistent la acțiunea endonucleazei de restricție corespunzătoare și care a putut fi hidrolizat numai prin mijloace chimice.

Ultima etapă a experimentului a constat în determinarea poziției grupărilor metil marcate, introduse în molecula de DNA. Analiza a stabilit că produsele metilării constau din  $\text{N}_6$ -metiladenină, sub forma unui dinucleotid dublu marcat și anume  $^{32}\text{P}$ -pAp- $^3\text{H}$ -6mA, care se află în secvența nucleotidică a centrului de recunoaștere al endonucleazei de restricție Eco RI.

În acest mod s-a demonstrat că ambele enzime ale sistemului R—M Eco I — endonucleaza de restricție și metilaza de modificare —

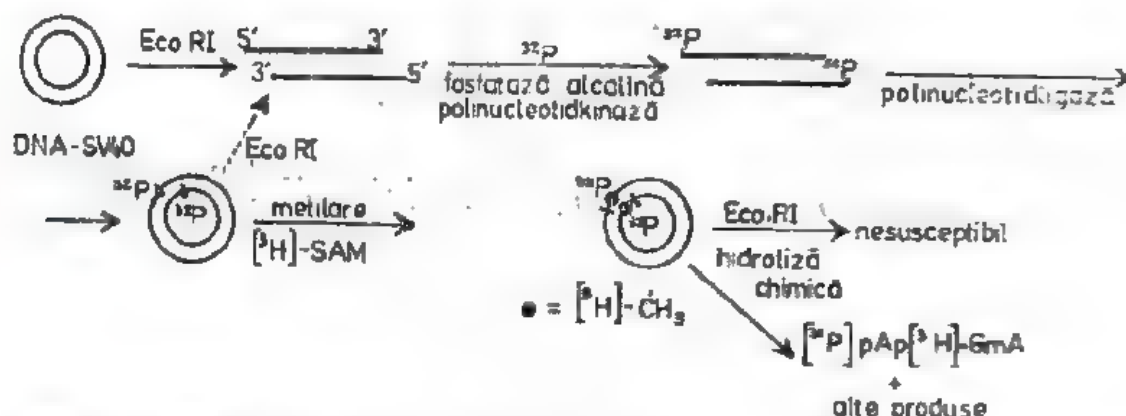
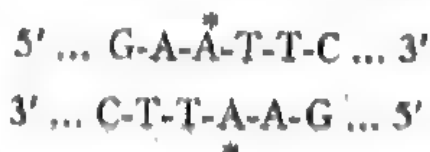


Fig. 12. Demonstrarea identității secvenței nucleotidice de recunoaștere, clivare și modificare pentru situsul R—M de tip II (după Dugaiczky și colab., 1974).

acționează asupra aceleiași secvențe nucleotidice. În DNA complet modificat, fiecare catenă este purtătoarea cîte unei adenine metilate ( $\text{A}^*$ ):



Schematic, experimentul poate fi redat ca în fig. 12.





ele vor fi identice. În acest caz, se spune că este vorba de *secvența palindrom*.

Întrucât lanțurile individuale ale zonelor palindromice din duplexul de DNA sînt autocomplementare, ele pot fi relativ ușor detectate și izolate. Folosindu-se diverse tehnici de separare s-a demonstrat că DNA din celulele eucariote, spre deosebire de cel al celulelor procariote, este caracterizat de existența a numeroase zone palindromice. Într-un genom pot exista mii de zone palindromice, deci cîteva procente din structură. Lungimea zonelor palindromice este variabilă, dar poate ajunge la sute sau chiar mii de perechi de baze. Zonele care conțin palindroame pot fi foarte apropiate unele de celelalte sau pot fi despărțite de sute sau de mii de alte perechi de baze.

Prin plierea catenelor polinucleotidice care conțin palindroame se pot forma zone duplex intracatenare, cu așezarea bazelor față în față, în ordine reciprocă inversă. Apar așa-numitele forme „cruciforme”. Dacă intervine o denaturare a duplexului, aceste forme cruciforme vor da naștere unor regiuni „în ac de păr”, denumite *fold-back* sau *snap-back* (fig. 13) (Engberg și Klenow, 1977).

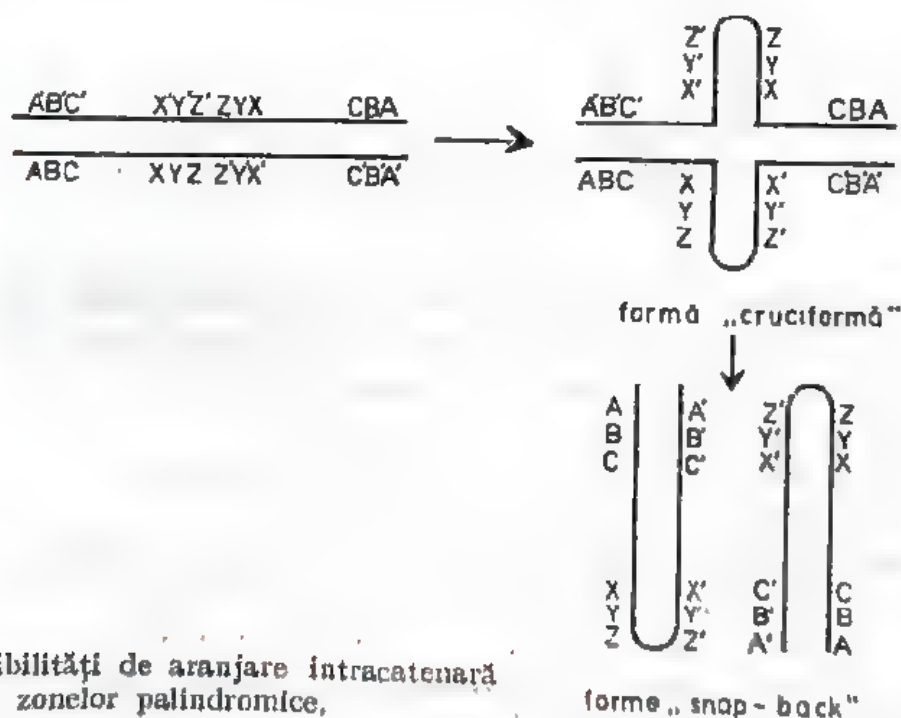


Fig. 13. Posibilități de aranjare intracatenară a zonelor palindromice,

În majoritatea cazurilor, funcția acestor zone palindromice este necunoscută, dar în ultimii ani s-a stabilit, ca o caracteristică a enzimelor de restricție și de modificare de tip II, necesitatea existenței în duplexul de DNA a unor baze perechi, așezate în ordine reciprocă inversă, pentru ca enzimele să-și poată îndeplini funcțiile.

B. *Mecanismul de acțiune al enzimelor de restricție de tip II (cazul Hind II)*. Enzima Hind II are, după cum s-a arătat în tabelul 1, un

centru de recunoaștere care conține următoarea secvență hexanucleotidică:

5' ... GpTpPy ↓ pPupApC ... 3'

3' ... CpApPup ↑ PypTpG ... 5'

Trecând — pentru moment — peste ambiguitatea zonei centrale a secvenței de recunoaștere, se constată că secvența de mai sus, care este

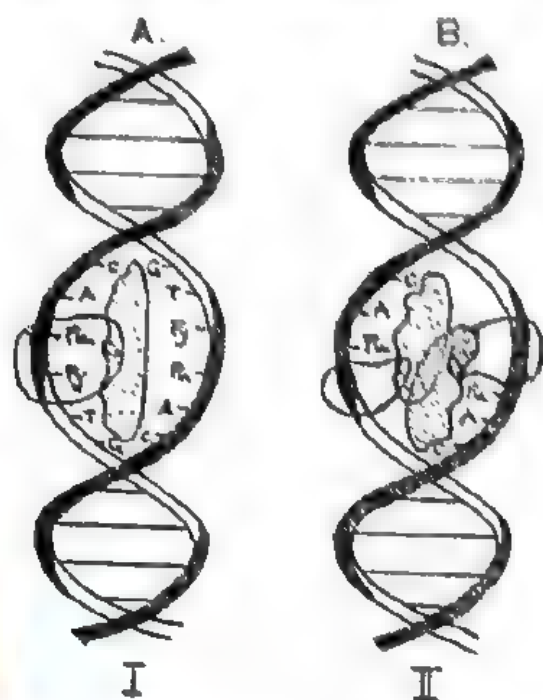


Fig. 14. Recunoașterea secvenței nucleotidice simetrice de către endonucleaza restrictivă Hind II (după Kelly și Smith, 1970).

un palindrom, prezintă o simetrie rotațională dublă, după cum s-a precizat anterior. Mai mult ca sigur că această simetrie constituie o reflec-tare a comportării fundamentale a enzimei în cadrul mecanismului de clivare a DNA.

Kelly și Smith (1970) au propus două modele posibile de acțiune a enzimei (fig. 14).

Conform primului model (fig. 14, I) o singură moleculă de pro-teină enzimatică recunoaște cele șase baze ale palindromului de pe o cătenă și provoacă o creștătură. Prezența centrului de recunoaștere simetric permite enzimei să recunoască și să taie catena complementară în exact aceeași poziție, datorită simetriei rotaționale duble, obținân-du-se astfel clivarea duplexului. Dacă secvența de recunoaștere ar fi fost asimetrică și ambele procese — de recunoaștere și de clivare — ar fi implicat doar una dintre catene, ar fi fost necesare două enzime, cu două situsuri de recunoaștere specifice și diferite.

O posibilitate și mai interesantă este oferită de cel de al doilea model (fig. 14, II), care sugerează că simetria centrului de recunoaștere ar re-reflecta inclusiv o simetrie intrinsecă a enzimei (Kelly și Smith, 1970; Boyer, 1971). Este posibil ca proteinele enzimatică, formate din sub-



unități identice sau aproape identice, să prezinte o axă rotațională dublă. Aceste considerații sugerează posibilitatea ca recunoașterea situsului să se facă concomitent pe ambele catene ale duplexului, fiecare subunitate enzimatică recunoscând o aceeași secvență de trei baze. Din punct de vedere al economiei de informație genetică este mai „ieftin” să se producă două subunități capabile să recunoască aceeași secvență scurtă dintr-o secvență mai lungă în ambele catene, decât să se „fabrice” o proteină mult mai mare, care să recunoască întreaga secvență.

În acest model, fiecare din cele două subunități enzimatică identice este constituită din alte două subunități diferite, una de „recunoaștere” și una de „clivare” (de rupere). Această „diviziune a muncii” ar putea avea loc din două motive. În primul rând, există dovezi genetice că în procesele de restricție și de modificare, din sistemul *E. coli*, sînt incluse produsele a cel puțin trei gene: unul din produse îndeplinește funcția de restricție, un altul pe cea de modificare, iar al treilea produs are rolul de a determina specificitatea de situs (Arber și Linn, 1969). În al doilea rând, secvența de recunoaștere a endonucleazei de restricție are două nivele diferite de specificitate: perechile de baze din zona centrală sînt – uneori – numai parțial specificate, în timp ce restul secvenței este strict specificată. Numeroase nucleaze au acest tip de specificitate parțială, de exemplu DNaza pancreatică, ce rupe preferențial legăturile fosfodiesterice PupPy.

Astfel, specificitatea parțială a enzimei de restricție *Hind* II în zona de rupere ar putea fi determinată de subunitatea nucleazică ce se leagă în această zonă, în timp ce specificitatea absolută a enzimei pentru restul secvenței necesită prezența subunității de recunoaștere.

Așa după, cum s-a arătat la începutul prezentării mecanismului de acțiune a enzimei *Hind* II, se pare că recunoașterea simetrică a secvențelor este o regulă generală pentru enzimele de restricție de tip II. S-ar putea ca mecanismul sugerat de Kelly și Smith, în special cel de al doilea, să fie valabil și pentru alte enzime de restricție, cu atît mai mult cu cît în cazul *Eco* RI, de exemplu, s-a stabilit că molecula enzimei este un dimer (mai mult ca sigur un homodimer, adică un dimer format din subunități identice).

Se poate afirma că, dintre enzimele care recunosc anumite secvențe specifice în DNA, endonucleazele de restricție par a fi cele mai discriminatorii. Cum poate fi atinsă o atît de strictă specificitate?

În general, aceasta se realizează pe baza unor modificări structurale ale duplexului de DNA, întrucît din studiile experimentale întreprinse s-a stabilit că, în DNA cu configurație dublu helicoidală, enzimele recunosc cu mare greutate anumite secvențe nucleotidice specifice. Crick a arătat că, de obicei, centrii activi ai enzimelor sînt localizați în unele „cavități” existente în structura lor. Fără a valida universalitatea acestei presupunerii, Meselson și colab. (1972) au sugerat că este de așteptat

ca secvențele nucleotidice de recunoaștere pentru endonucleazele de restricție să se preteze la un anumit aranjament spațial, care să permită funcționarea sistemului „cheie-broască” (enzimă-substrat).

Modelul propus de Meselson și colab. (fig. 15) constituie o posibilă rezolvare a problemei: în zona situsului de recunoaștere duplexul se

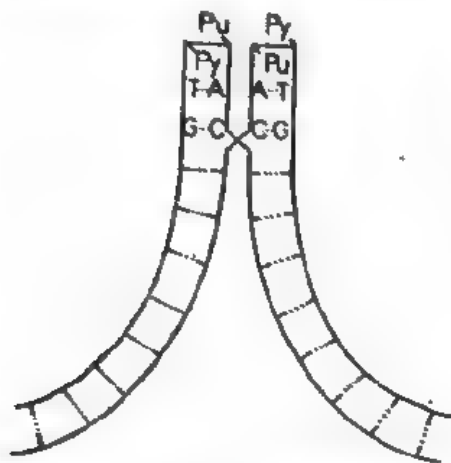


Fig. 15. Rearanjarea moleculară a secvențelor nucleotidice cu simetrie rotațională dublă din situsuri de recunoaștere pentru *Hind II* (după Meselson și colab., 1972).

desface, iar perechile de baze se refac în cadrul aceleiași catene, cu apariția structurilor numite *fold-back* sau *snap-back*. În acest mod se creează o cavitate, precum și două zone („bucle”) în care se află bazele centrale ale secvenței de recunoaștere, nelegate prin punți de hidrogen. De aici s-ar mai putea presupune și faptul că bazele Pu și Py nu sînt, în mod obligatoriu, complementare.

Acest tip de structură are o comportare specială, care ar putea — eventual — să contribuie la explicarea mecanismului procesului de restricție și anume:

- posibilitatea de formare a „buclelor” este limitată de anumite secvențe nucleotidice și anume numai la cele care prezintă o simetrie rotațională dublă; apar structuri noi, total diferite de dublul helix clasic al DNA, ceea ce face ca o parte din dificultățile de recunoaștere specifică de către enzima de restricție a secvenței specifice să fie depășite;

- noul aranjament al bazelor în cadrul situsului de recunoaștere face ca interacțiunea DNA cu enzimele să fie mult facilitată față de structura duplex;

- datorită existenței „buclelor”, centrul de recunoaștere poate fi înglobat în cavitatea care adăpostește centrul activ al enzimei de restricție.

De asemenea, s-ar putea ca tocmai această structură specială pe care o poate dobîndi DNA în zona palindromului de recunoaștere pentru endonucleazele de restricție, să-l facă accesibil și enzimelor de modificare corespunzătoare dintr-un anumit sistem *R-M*.

În cazul enzimei de restricție *Eco RI*, folosindu-se drept substrat un octanucleotid sintetic autocomplementar, care conține secvența de recunoaștere pentru sistemul *R-M Eco RI*, s-a constatat că tempera-



tura optimă de lucru pentru ambele enzime din sistem (endonucleaza și metilaza) coincide cu temperatura de topire ( $T_m$ ) a structurii duplex respective, ceea ce ar veni în sprijinul teoriei *snap-back* („ac de păr”).

Există însă și păreri contrare; de exemplu, în cazul sistemului *R-M Eco I*, Boyer și colab. (1971) au constatat că ambele enzime pot acționa foarte bine și asupra duplexului nemodificat prin formarea structurilor în „ac de păr”.

**III.3.1.5. Proprietățile unor enzime de restricție și modificare de tip II.** Dintre numeroasele enzime de restricție și de modificare izolate și caracterizate pînă în prezent, au fost alese doar cîteva exemple, pentru a prezenta diversitatea proprietăților lor.

*Proprietățile sistemului Eco I.* Endonucleaza și enzima de modificare *Eco I* au fost izolate din *E. coli*. Sistemul *R-M Eco I* este controlat genetic de către DNA plasmidic bacterian, după cum au arătat Watanabe și Noshida (1953) și Yoshimori și colab. (1972): inițial, genele pentru acest sistem au fost asociate cu un factor plasmidic  $fi^+R$ , dar ulterior s-a constatat că, de fapt, sînt controlate de o plasmidă mică (masa moleculară  $7 \times 10^6$  daltoni) (Betlach și colab., citați de Boyer și colab. 1974).

În sistemul *R-M Eco I* există două enzime cu entități diferite, și anume o enzimă de restricție și o enzimă de modificare. Ele au putut fi izolate și purificate pînă la un înalt grad de omogenitate, ceea ce a permis chiar determinarea compoziției lor în aminoacizi (tabelul 5).

Tabelul 5

Compoziția în aminoacizi a endonucleazei restrictive și a metilazei din sistemul *Eco I* (după Boyer și colab., 1974)

Aminoacidul	Moli		Resturi aminoacid/subunitate	
	metilază	endonuclează	metilază	endonuclează
Cys + Cys-S-S-Cys	2,00	0,66	6,13	1,70
Asp	18,80	14,50	57,50	37,30
Thr	2,58	3,58	7,89	9,23
Ser	7,20	6,84	22,00	17,70
Glu	7,91	10,50	24,10	27,20
Pro	3,10	2,85	9,50	7,37
Gly	5,47	6,10	16,70	15,70
Ala	3,03	5,66	9,20	14,60
Val	5,09	5,61	15,60	14,50
Met	0,28	1,70	0,84	4,30
Ileu	6,01	7,92	18,40	20,40
Leu	8,00	10,20	24,50	26,30
Tyr	5,52	2,72	16,90	7,09
Phe	9,15	5,87	27,90	15,10
Lys	9,34	7,63	28,60	19,70
His	2,03	2,03	6,23	5,25
Arg	3,68	4,66	11,28	12,10

Compararea compoziției celor două enzime din sistem arată existența unei mari asemănări, ceea ce sugerează că ele au provenit de la o genă comună, care probabil a suferit un proces de divergență în cursul evoluției (Boyer și colab. 1974).

Preparatele de endonuclează de restricție Eco I, analizate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă cu DDS sau prin ultracentrifugare, s-au dovedit a fi omogene: masa moleculară a formei denaturate și reduse a fost de 28500 daltoni. În absența agenților de reducere și de denaturare s-au identificat dimeri și tetrameri, activi enzimatic, cu masele moleculare de 57000 și, respectiv 114000 (Modrich și Zabel, 1976). Metilaza de modificare Eco I constă însă dintr-un monomer, cu o masă moleculară de 40000—55000 daltoni (Roulland-Dussoix și colab., 1974; Greene și colab., 1974).

Activitatea endonucleazei de restricție Eco I se desfășoară în condiții optime la pH 7,5, în tampon Tris 0,1 M, în prezența ionilor de  $Mg^{2+}$  la o concentrație de 0,01 M, la 37°C.

Totodată, s-a constatat că, în timp ce între concentrația de Eco RI și viteza reacției endonucleolitice pe care o catalizează există o relație liniară (fig. 16), pentru metilaza corespunzătoare relația este neliniară,

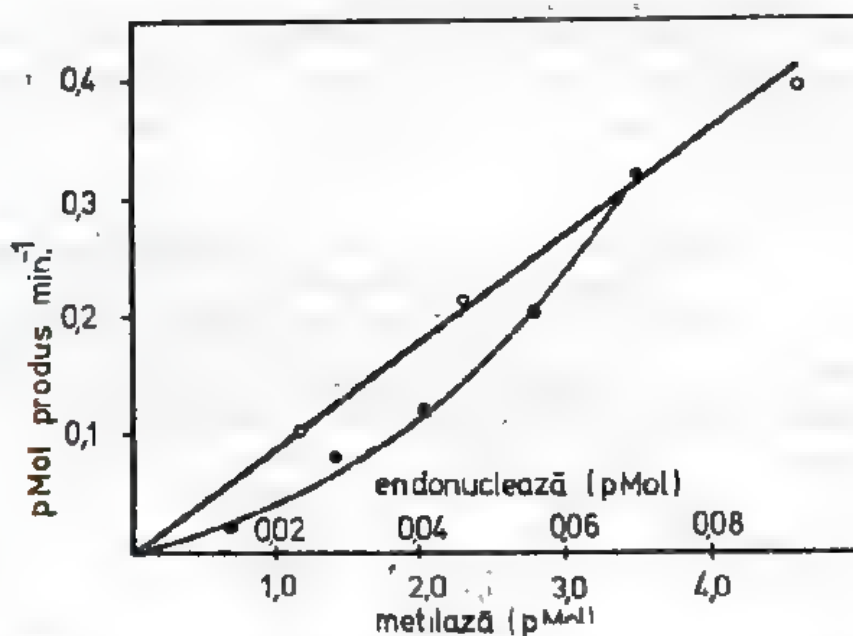


Fig. 16. Variația vitezei reacțiilor de metilare (●) și de fragmentare endonucleolitică (○), pentru sistemul *R-M* Eco RI în funcție de concentrația enzimei (după Boyer și colab., 1974).

ceea ce a sugerat existența unor interacțiuni cooperative între moleculele de metilază, cu apariția unor oligomeri.

Metilaza Eco I acționează asupra DNA din bacteriofagul  $\lambda$  și din virusul SV40, introducând câte 10 și, respectiv 20 M de grupări metil per mol de genom, ceea ce corespunde cu numărul situsurilor de rupere



pentru enzima de restricție Eco RI față de substraturile citate (Boyer și colab., 1974) și aduce un nou argument în favoarea identității secvenței nucleotidice a situsului de recunoaștere, de metilare și de clivare.

*Proprietățile sistemului Eco II.* Genele pentru enzimele Eco II se găsesc pe o plasmidă *fi-R*, denumită R15, care codifică rezistența față de o serie de antibiotice. Endonucleaza de restricție nativă are o masă moleculară de aproximativ 86000, cu subunități în jur de 40000 daltoni, iar metilaza are o masă moleculară de 55000 daltoni (Roulland-Dussoix și colab., 1974). Metilaza Eco II produce metilarea a 32 resturi de citozină în DNA  $\lambda$  și SV40, ceea ce este în bună concordanță cu numărul de legături fosfodiesterice hidrolizate de către endonucleaza Eco RII (Bigger și colab., 1973; Subramanian și colab., 1974).

*Proprietățile endonucleazei Bam HI.* Smith și Chirikjan (1979) au purificat din *Bacillus amyloliquefaciens* (RUB 500) o endonuclează de restricție. La electroforeză pe gel de poliacrilamidă, în prezența DDS, enzima disociază în subunități cu masa moleculară de  $22000 \pm 500$ . pH-ul optim al enzimei se află într-o zonă foarte îngustă, în jurul lui 8,5. Pentru desfășurarea activității sale, enzima Bam necesită prezența ionilor  $Mg^{2+}$ , care pot fi parțial înlocuiți prin ioni  $Mn^{2+}$ . Enzima este stabilă cel puțin un an, în tampon Tris 20 mM—HCl pH 7,5 cu EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM și 10% glicerol. Endonucleaza nativă se găsește ca dimer cu masa moleculară de  $46000 \pm 500$ , iar în absența sărurilor se poate izola și un tetramer cu masa moleculară de  $90000 \pm 500$ . Această proprietate este comună cu alte două endonucleaze de restricție, Eco RI și Bst I. În tampon cu NaCl 0,1 M enzima rămâne stabilă pînă la 70°C. Bam HI este o enzimă de restricție pentru care nu s-a descoperit, încă, o metilază de modificare corespunzătoare.

*Proprietățile sistemului Bsp.* Koncz și colab. (1978) au purificat împreună o endonuclează de restricție și o metilază din *Bacillus sphaericus*. Analiza prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă cu DDS a arătat că endonucleaza este un polipeptid cu masa moleculară de 35000, iar activitatea optimă o are la pH în jurul valorii 8,2. Activitatea enzimei se manifestă în prezența ionilor  $Mg^{2+}$  la o concentrație optimă de 20 mM. Prezența ionilor  $Zn^{2+}$  inhibă reacția. Randamentul de obținere a enzimei de restricție Bsp este superior oricărei alte endonucleaze de restricție cunoscute pînă în prezent. S-a constatat că această enzimă este capabilă să hidrolizeze și legăturile fosfodiesterice din DNA monocatenar, dar cu o viteză mult mai mică decît în cazul DNA bicatenar. Referitor la metilaza corespunzătoare, autorii precizează că ea transferă grupările  $-CH_3$  de la SAM la citozina din secvența:

5' ... G-G-C-C ...

... C-C-G-G ... 3'

### III.3.2. Sisteme *R-M* de tip I

Se cunosc și sisteme *R-M* care conțin enzime mult mai complexe și care — pentru a-și putea exercita acțiunea — cer prezența unei serii de cofactori. Centrul nucleotidic de recunoaștere este același, atât pentru fenomenul de restricție, cât și pentru cel de modificare, dar în timp ce modificarea DNA prin metilare are loc în zona centrului de recunoaștere, clivarea duplexului de DNA — după cum se va arăta ulterior — se face în afara acestei secvențe (Horiuchi și Zinder, 1972; Vovis și colab., 1973; Linn și colab., 1974; Hartman și Zinder, 1974).

Cele mai cunoscute și mai studiate sisteme *R-M* de tip I sînt Eco *K* și Eco *B*, izolate ambele din *E. coli* tulpina K12 și respectiv *B. Impleună* cu alte sisteme *R-M* din alte tulpini de *E. coli* și din *Salmonella typhimurium*, Eco *K* și Eco *B* formează o familie de enzime înrudite genetic și funcțional; genele pentru diverse sisteme sînt alele și se pot înlocui reciproc, în cazul unor deficiențe mutaționale. Pe baza unor date genetice s-a acceptat în general, dar încă nu s-a arătat în mod concret, că responsabil de recunoașterea substratului de DNA este produsul unei singure gene. Este de așteptat ca acest produs să fie prezent atât în endonucleaza de restricție, cât și în metilaza de modificare.

Enzimele de restricție și metilazele de modificare ale sistemului *R-M* Eco *K* și Eco *B* au fost obținute cu un grad înalt de puritate și s-a constatat că *in vitro* acționează numai asupra DNA nemodificat. Analiza compoziției subunităților acestei enzime a arătat că se pot forma oligomeri din trei polipeptide diferite, denumite  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , cu mase moleculare de 135000, 60000 și 55000. Pentru exprimarea activității de restricție este necesară prezența a cel puțin a cîte unei subunități din fiecare tip; de exemplu, pentru enzima de restricție Eco *K* ar corespunde, din acest punct de vedere, o formulă  $\alpha_2\beta_2\gamma$ , cu o masă moleculară de 450000 daltoni. Același complex enzimatic poate prezenta și o activitate de modificare prin metilare. Modificarea se poate obține și cu o enzimă cu masă moleculară mai mică, formată exclusiv din subunități  $\beta$  și  $\gamma$ , ceea ce înseamnă că una dintre aceste subunități este neapărat implicată în acțiunea de recunoaștere a situsului de pe duplexul de DNA, precum și în fenomenul de modificare, în timp ce subunitatea  $\alpha$  este direct legată de reacția de restricție.

Totuși, între enzimele de restricție și de modificare de tip I există unele relații care intrigă și care nu au fost complet înțelese. După cum s-a arătat mai sus, preparatele de endonuclează de restricție *K*, de înaltă puritate, au și o activitate de metilază *K* specifică. Metilaza *K* de modificare nu are însă activitate de restricție. În sistemul Eco *B* s-au găsit două metilaze de modificare: una dintre ele nu prezintă acțiune de hidroliză asupra fosfodiesterilor, în timp ce cealaltă pare a fi și o endonuclează de restricție tipică. De aici s-a tras concluzia că în cadrul sistemelor *R-M* de tip I ambele activități sînt exercitate de către aceeași



proteină care, la un moment dat, ar putea să disocieze, formînd enzima de modificare, ce nu mai are acțiune de restricție.

Susceptibilitatea unei molecule de DNA la restricție și modificare depinde de prezența unui situs de recunoaștere nemodificat, ceea ce înseamnă că nucleotidele care suferă metilarea în cursul reacției de modificare fac parte din situsul de recunoaștere. Prin mutație, un astfel de situs de recunoaștere poate fi pierdut sau cîștigat. Numărul și poziția situsurilor de recunoaștere sînt determinate genetic.

Pe baza frecvenței acestor situsuri și considerînd că ele apar la întîmplare pe duplexul DNA este de așteptat ca secvențele de recunoaștere pentru Eco *K* și Eco *B* să conțină 6–8 perechi de nucleotide, așezate în secvență continuă sau discontinuă, după cum au presupus Arber și Linn (1969).

În concordanță cu cele de mai sus, s-a arătat că DNA din mutanții fagici, izolați pe baza lipsei lor de sensibilitate la enzima de restricție Eco *B*, nu au constituit substrat nici pentru enzima de modificare din sistemul respectiv. De asemenea, s-a stabilit că la tulpina sălbatică a bacteriofagilor respectivi centrul de recunoaștere poate fi modificat prin metilarea adeninei pe care o conține. Pînă în prezent, încercările de determinare a secvenței de nucleotide în jurul N<sub>6</sub>-metiladeninei (adenină N<sub>6</sub>-modificată) nu au dus la nici un rezultat. Deocamdată nu se cunoaște compoziția nucleotidică a situsului de recunoaștere la Eco *K*.

Folosind ca substrat molecule de DNA cu un singur situs de recunoaștere pentru Eco *B*, clivarea sub acțiunea enzimei de restricție se petrece în mai multe puncte. De aici concluzia că situsurile de rupere sînt diferite de cele de recunoaștere, dar nu se știe ce element anume determină situsurile de rupere.

Foarte recent s-a reușit stabilirea secvenței nucleotidice din centrul de recunoaștere pentru una din endonucleazele de tip I și anume pentru Eco *B* (Ravetch și colab., 1978). Centrul de recunoaștere al acestei enzime constă dintr-o secvență de 15 nucleotide, care include la un capăt trimerul nucleotidic 5'-T-G-A-3', urmat de un domeniu de opt nucleotide variabile, după care, la celălalt capăt, se află tetramerul 5'-T-G-C-T-3'. Secvența determinată nu prezintă, ca în cazul endonucleazelor de restricție de tip II, o simetrie rotațională dublă. Înlocuirea unei singure baze din domeniile cu secvență nucleotidică constantă (zona trimerului sau cea a tetramerului) duce la pierderea selectivității pentru ambele activități, de restricție și de modificare. După cum s-a determinat, modificarea are loc la două resturi de adenină, unul din trimerul 5'-T-G-A-3' și celălalt din catena complementară tetramerului 5'-T-G-C-T-3' și anume la primul reziduu, corespunzător 5'-T.

Întrucît cele două domenii nucleotidice de compoziție constantă sînt separate de opt baze și deoarece structura de dublă elice a DNA are o periodicitate de 10 perechi de baze (Watson și Crick, 1953), rezultă

că trimerul și tetramerul de compoziție constantă se află de aceeași parte a duplexului de DNA. Mai mult chiar, cele două grupări metil — introduse prin modificare în pozițiile prezentate mai sus — se află de asemenea de aceeași parte a duplexului, în scobitura cea mare, cu un unghi de  $\approx 70^\circ$  între ele. De aici concluzia că enzima *Eco RB* interacționează cu o singură catenă a duplexului.

**III.3.2.1. Etapele procesului de restricție cu endonucleaze de tip I și rolul cofactorilor.** Pentru a funcționa, sistemele *R-M* de tip I reclamă prezența a numeroși factori: S-adenozil-*L*-metionină (Ado-Met sau SAM), ATP și  $Mg^{2+}$  pentru activitatea de restricție (Meselson și Yuan, 1968; Linn și Arber, 1968). Modificarea poate avea loc și în prezența doar a SAM, deși s-a constatat că prezența ATP și  $Mg^{2+}$  o stimulează. Pentru explicarea mecanismului prin care acționează sistemele *R-M* de tip I cu participarea efectorilor enunțați, Boyer (1971) a propus modelul reprezentat în fig. 17.

Studiile întreprinse pînă în prezent asupra rolului cofactorilor au arătat că ambele procese — de restricție și de modificare — pot fi obținute cu aceeași enzimă nativă, într-o succesiune de reacții. Unii dintre intermediarii care apar în cursul acestor procese au putut fi izolați și studiați. De exemplu, complexii enzimă-substrat (enzimă de restricție-DNA) pot fi stabilizați prin adăugare de EDTA.

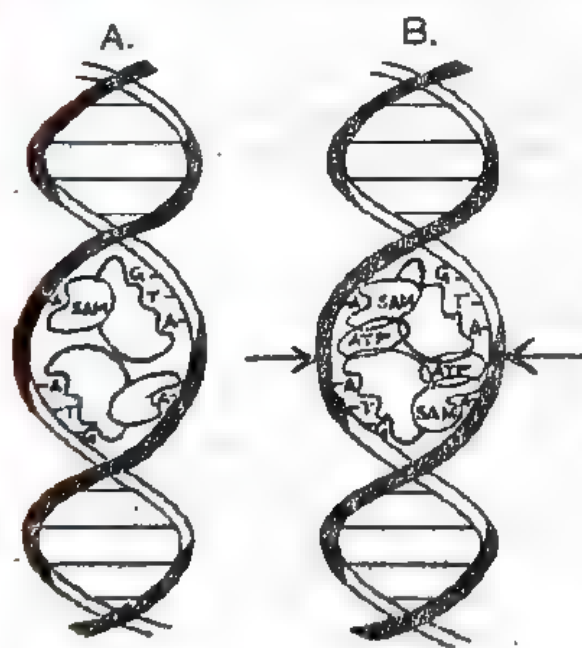


Fig. 17. Modele posibile pentru acțiunea restrictazei (A) și a metilazei (B) de tip I (după Boyer, 1971).

Arber și colab. (1974) au propus următoarea secvență de evenimente care poate duce fie la restricție, fie la modificare (fig. 18).

**A. Legarea SAM la enzimă.** Enzima *Eco K* nativă, nu și cea care a fost inactivată prin căldură, leagă SAM. Reacția nu necesită prezența  $Mg^{2+}$  și a ATP. Complexul SAM-enzimă, purificat pe coloană de Sephadex G-50, s-a incubat cu un amestec de reacție în vederea procesului de



restricție, fără a se mai adăuga alți cofactori, în afară de SAM deja existent. Se produce ruperea, clivarea duplexului de DNA. De aici concluzia că legarea SAM la enzimă trebuie să fie specifică, iar complexul rezultat

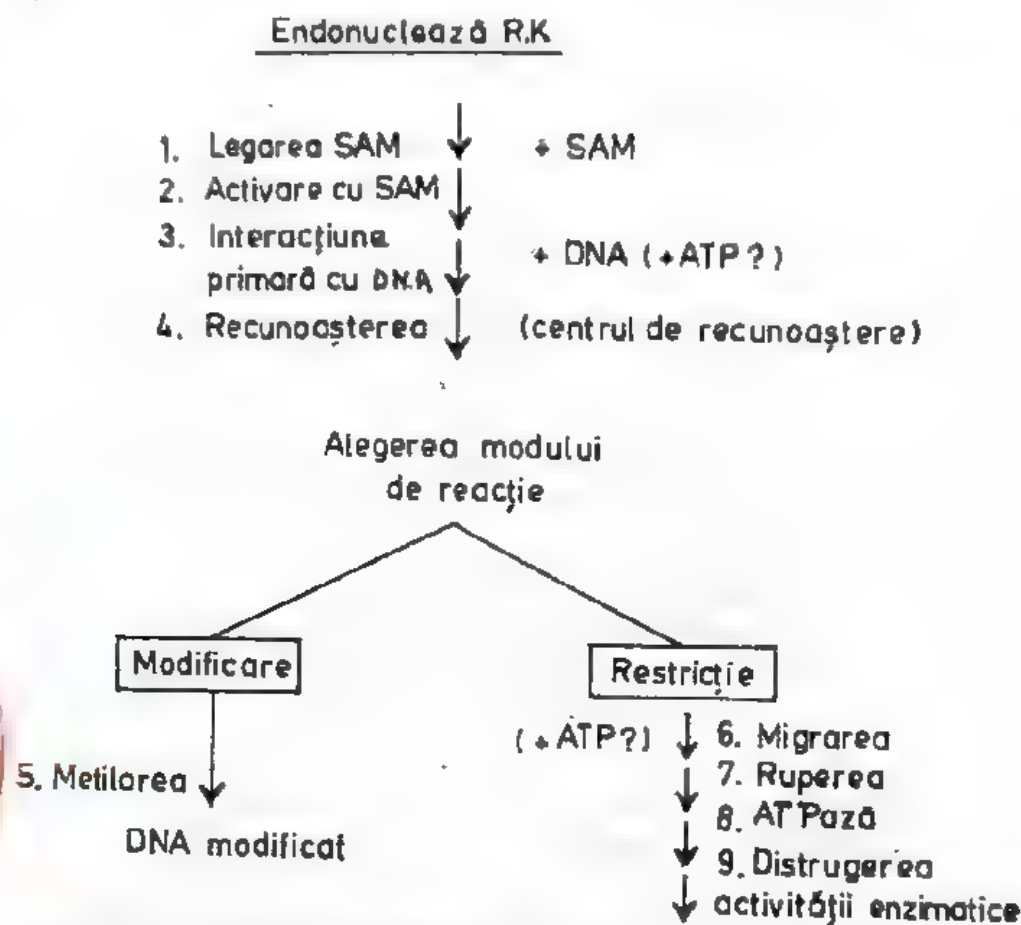


Fig. 18. Succesiunea reacțiilor în cursul procesului de restricție-modificare în sistemele R-M de tip I (după Arber și colab., 1974).

nu mai necesită o cantitate suplimentară de SAM. Tot de aici, se poate presupune că SAM ar putea juca rol de efector alosteric, după cum au demonstrat recent Yuan și Reiser (1978).

B. *Activarea enzimei cu SAM*. Procesul de activare a enzimei se pare că se datorește unor modificări conformaționale ale enzimei. S-a constatat că forma activată a enzimei este instabilă și că se distruge rapid în absența duplexului de DNA ca substrat. Noile specii, inactive, se pot reactiva în prezența unor concentrații mari de SAM. Încă nu s-a stabilit cu precizie dacă SAM este consumat numai ca donator de grupări metil de către endonucleazele Eco B, Eco K etc. sau constituie și un furnizor de energie, alături de rolul său de efector alosteric sau dacă îndeplinește toate aceste funcții. S-a presupus că această dependență de SAM a unor sisteme R-M ar putea să reprezinte un mecanism de control al celulei contra „sinuciderii”.

C. *Interacțiunea primară cu DNA*. Enzima activată poate să interacționeze cu orice DNA, încercând să găsească centrul de recunoaștere. Fără îndoială, distrugerea formei activate poate fi preîntâmpinată prin

adăugarea de DNA modificat sau a unui DNA mutant, fără centru de recunoaștere. Această protejare față de inactivare nu necesită prezența ATP. Enzima protejată se poate testa prin adăugarea de DNA nemodificat și ATP. Aceste fapte sugerează că enzima activată intră rapid în interacțiune cu DNA și rămâne stabilizată pînă la desfacerea de pe DNA. Cîtă vreme este activă, enzima poate interacționa din nou cu DNA, indiferent dacă este vorba de o conformație liniară sau circulară a duplexului, prezența unor capete libere ale moleculei nefiind necesară.

Modificarea este influențată de ATP, acest cofactor facilitînd metilarea, dar nefiind util în procesul de recunoaștere. Rolul ATP îl depășește pe cel de simplu furnizor de energie în reacția hidrolitică, dar nu i s-a găsit un rol alosteric, precum pentru SAM, decît în ultimul timp (Yuan și Reiser, 1978). S-ar putea ca hidroliza ATP să dea energia necesară pentru unele modificări conformaționale ale complexului enzimă-DNA. Trecerea ATP în ADP și  $P_i$  are loc în exces față de numărul de legături rupte în DNA și continuă mult după ce procesul de clivare a duplexului s-a terminat.

D. *Procesul de recunoaștere și alegerea căii de reacție a enzimei.* După decelarea centrului de recunoaștere, enzima este pusă în situația să „aleagă” una dintre cele două posibile căi de acțiune. Centrul de recunoaștere există în trei forme posibile:  $s:s$  (centru de recunoaștere homoduplex, nemodificat),  $s^m:s^m$  (centru de recunoaștere homoduplex, modificat în ambele catene),  $s_m:s$  (centru de recunoaștere heteroduplex, modificat pe o singură catenă).

*In vitro*, s-a stabilit că reacțiile de modificare și restricție pot avea loc numai cu homoduplexul de DNA nemodificat,  $s:s$ . S-a găsit că restricția este un proces rapid, iar modificarea este mult mai lentă, mai ales în absența  $Mg^{2+}$  și a ATP, pentru a preîntîmpina clivarea, care depinde cu totul de acești cofactori. Deci, endonucleaza de restricție nu acționează nici pe  $s^m:s^m$ , nici pe  $s^m:s$ , dar duplexul de tip  $s^m:s$  este un foarte bun substrat pentru modificarea *in vitro* și pentru studierea rolului cofactorilor asupra acestui proces: modificare lentă în absența ATP (30 minute) și mult mai rapidă (1 minut) în prezența ATP. Experimentele de modificare pe homoduplex  $s:s$  durează cca 9 ore, în absența ATP. În acest fel s-a arătat că alegerea de către enzimă a căii de reacție (spre modificare sau spre restricție) depinde numai de natura duplexului din zona de recunoaștere și nu de prezența sau de absența ATP, cum se crezuse inițial.

În celulele bacteriene în creștere, heteroduplexul  $s^m:s$  este un substrat natural pentru modificare. Metilarea *in vivo* a centrului de recunoaștere are loc rapid, după apariția noilor catene de DNA în cursul multiplicării. Centrii  $s:s$  duc la restricție, iar  $s^m:s$  duc la modificare. Experimentele cu tulpini de bacteriofag  $\lambda$  avînd un singur centru de recunoaștere pentru sistemul  $R-M$  Eco K, au sugerat că probabilitatea



de modificare a acestui unic centru este de cca 30 de ori mai mică decât probabilitatea de a suferi procesul de restricție. Pentru moleculele de DNA avînd mai mult decît un centru de recunoaștere nemodificat, integritatea biologică se păstrează numai dacă toți centrii de recunoaștere sînt modificați, ceea ce se petrece foarte rar în condiții naturale.

Rezultatele obținute pînă în prezent au arătat că reacțiile *in vitro* sînt foarte asemănătoare cu cele *in vivo*. Aceste constatări au demonstrat că recunoașterea implică ambele catene ale duplexului și că secvențele heteroduplex  $s^m$ : s nu corespund din punct de vedere al restricției.

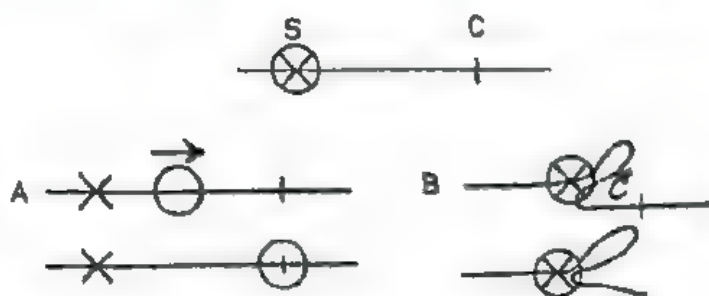
În această discuție s-a presupus că ambele procese — de restricție și de modificare — sînt îndeplinite de una și aceeași enzimă nativă. Faptul s-a dovedit real *in vitro*, dar s-ar putea ca să existe totuși diferențe față de procesele care au loc în celulele vii.

E. *Modificarea prin metilare*. Mecanismul acestui proces nu se cunoaște încă. Probabil că una dintre moleculele de SAM, legate de enzimă în cursul procesului de activare, devine donor de grupări metil în cursul acestei reacții. Pentru modificarea heteroduplexului  $s^m$ : s pare suficientă o singură moleculă. Nu se știe încă sub ce formă și în ce moment enzima părăsește DNA și, dacă, eventual, ea mai poate interacționa încă odată.

F. *Migrarea la situsul de clivaj*. În contrast cu modificarea, hidroliza nu are loc la centrul de recunoaștere. Se poate presupune că enzima, după ce a ales calea de restricție pentru acțiunea ei ulterioară, migrează de-a lungul duplexului, de la centrul de recunoaștere spre situsul de rupere. Această deplasare necesită consum de energie, pe care o poate furniza ATP. S-au propus două modele pentru realizarea acestei migrări (fig. 19) (Arber și colab., 1974).

În modelul A se presupune că enzima se desprinde total de pe secvența de recunoaștere din duplex și că apoi migrează spre situsul de clivare (de hidroliză). Conform modelului B, enzima rămîne atașată la

Fig. 19. Migrarea endonucleazei de restricție R.K de la centrul de recunoaștere S la cel de rupere C: A) enzima se detașează de pe S; B) enzima rămîne atașată la S (după Arber și colab., 1974).



situsul de recunoaștere, iar trecerea la centrul de rupere (de clivare) s-ar realiza prin plierea duplexului de DNA; odată trecută de la S la C, enzima ar putea începe procesul de restricție. Deocamdată nu există dovezi experimentale pentru nici unul dintre modelele propuse, iar — pe de altă parte — s-ar putea ca în realitate transferul enzimei de la un centru la celălalt să se realizeze pe o altă cale, încă necunoscută.

Ar mai fi și problema conformației pe care o dobîndește centrul de recunoaștere după ce enzima a optat pentru calea acțiunii de restricție. Studiile întreprinse asupra produselor-limită ce se obțin la digestia cu endonucleazele de restricție Eco R.K și Eco R.B a diferitelor substraturi de DNA au arătat că orice secvență nucleotidică de recunoaștere poate servi ca semnal pentru enzimă o singură dată sau, în orice caz, de un număr limitat de ori. Explicația fenomenului nu se cunoaște. O posibilitate ar putea reieși din modelul B (fig. 18), alta ar consta în alterarea centrului de recunoaștere, dar nu există încă dovezi că acesta ar suferi o metilare.

Dacă centrul de recunoaștere ar fi alterat în cursul procesului de recunoaștere, s-ar pune problema și a existenței unor posibile procese de restaurare a acestui centru în molecula nativă. S-ar putea ca acest proces de reparare a DNA să aibă loc în cursul unor mutații.

G. *Ruperea duplexului de DNA*. Clivarea celor două catene ale DNA are loc în etape. O cantitate mică de enzimă produce creștături (tăieturi) numai pe una dintre catene; o concentrație mare de enzimă rupe ambele catene, dar și în acest caz au putut fi izolați intermediari cu o singură catenă hidrolizată. Practic, pentru ruperea duplexului, ar putea fi necesare două molecule de enzimă. În prezent, există dovezi experimentale obținute cu ajutorul endonucleazelor de restricție izolate din diverse tulpini mutante și care vin în sprijinul acestei ipoteze.

Independent de mecanismul foarte precis prin care ar avea loc această „complementare” *in vivo*, experimentele realizate *in vitro* au permis să se adopte părerea că mersul normal al reacției de restricție constă în activare și recunoaștere numai prin intermediul unei singure molecule de enzimă activată și că, ulterior, o nouă moleculă de enzimă, care nu mai este necesar a fi activată de către SAM, se atașază complexului deja existent și catalizează următoarea reacție, necesară pentru clivarea ambelor catene din duplexul de DNA.

Din motive necunoscute pînă în prezent, capetele fragmentelor rezultate la tăiere nu pot fi fosforilate sub acțiunea polinucleotidkinazei, nici după tratament cu fosfomonoesterază. Acest fapt face dificilă determinarea secvenței nucleotidice din centrul de clivare.

H. *Activitatea ATP-azică*. După ce enzima alege calea de restricție, se produce și liza ATP la ADP și  $P_i$ , care continuă pînă la completa hidroliză a duplexului de DNA. Această activitate, care nu necesită SAM, încetează după desprinderea enzimei de restricție de DNA. În acest mod, activitatea ATP-azică pare să fie o consecință a modificărilor secvențiale pe care le suferă enzima. Nu se știe deocamdată dacă efectul se datorește unui complex DNA-enzimă întreagă sau unui complex DNA-fragment enzimatic. De asemenea, încă nu s-a stabilit dacă efectul ATP-azic se petrece și *in vivo*.

I. *Absența turnover-ului în activitatea de restricție*. Activitatea ATP-azică sugerează că, după ruperea DNA, enzima sau o parte a ei rămîne



încă atașată de acidul nucleic hidrolizat. Se pare că fiecare enzimă intervine o singură dată în procesul de restricție și că în cursul acestuia este așa de tare alterată că nu mai poate hidroliza DNA.

Așa stînd lucrurile, se pune problema dacă termenul de „enzimă” este corect pentru endonucleazele *R.K* și *R.B*, cel puțin.

Deci, endonucleazele de restricție de tip I reprezintă un sistem complex de compuși cu masă moleculară mare și care, pentru a-și exercita acțiunea reclamă prezența unor efectori, care prin interacțiune cu „enzima” îi induc unele modificări funcționale.

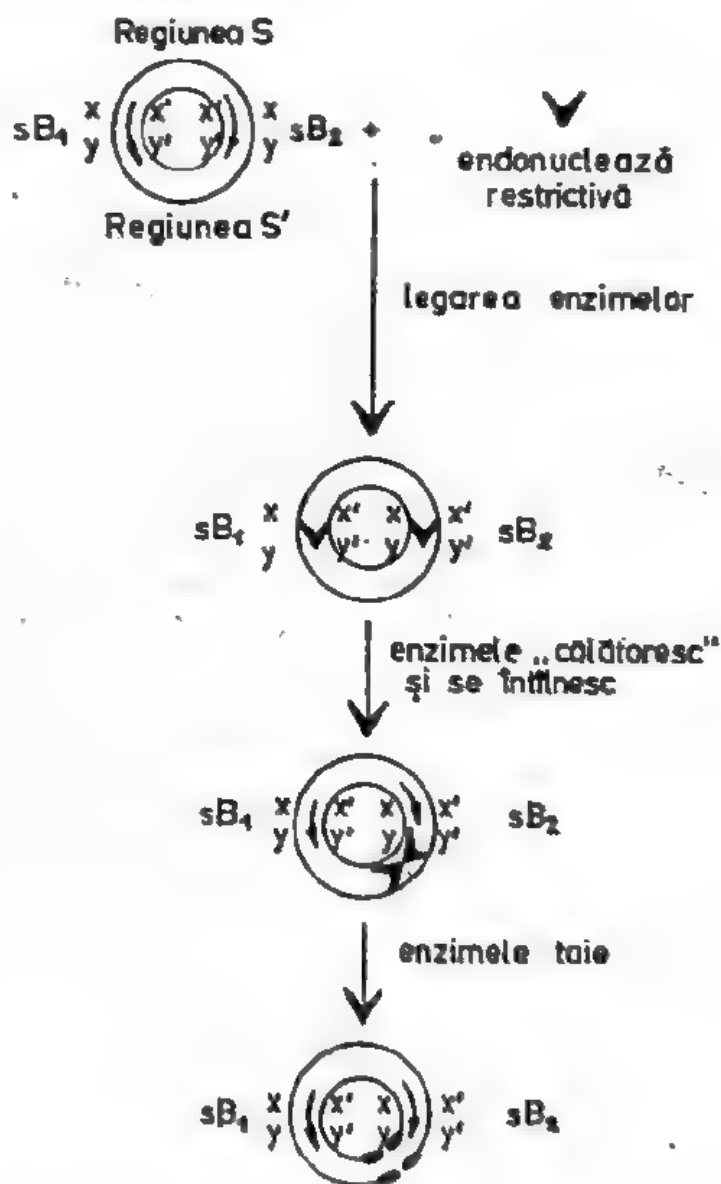


Fig. 20. Model pentru mecanismul de acțiune a enzimelor de restricție de tip I (după Schulman, 1974).

III.3.2.2. Mecanismul de acțiune al enzimelor de restricție de tip I. Pentru a explica mecanismul de acțiune al endonucleazelor de restricție de tip I, la care nu există identitate între centrul de recunoaștere pentru enzimă și locul unde aceasta își exercită acțiunea hidrolitică asupra moleculei bicatenare de DNA, Schulman (1974) a propus un model, pe care l-a denumit „al enzimelor călătoare” (*wandering enzymes*) (fig. 20).

Conform acestui model există o secvență de recunoaștere, specifică, asimetrică și nemodificată care permite legarea a două molecule de endonuclează de restricție la DNA, în zonele  $sB_1$  și  $sB_2$ . Odată legate, moleculele de enzimă încep să „călătorească” de-a lungul moleculei circulare, bicatenare de DNA, în funcție de orientarea pe care le-a imprimat-o centrul de recunoaștere. „Călătoria” se încheie la întâlnirea cap-la-cap a celor două molecule enzimatică. Aceasta ar reprezenta semnalul pentru tăierea duplexului de DNA. După ce are loc prima crestare a moleculei bicatenare, moleculele enzimatică nu vor mai putea „călători” la fel de ușor, ceea ce duce la limitarea situsurilor de rupere. Între cele două regiuni ale moleculei de DNA, care împreună alcătuiesc situsul de recunoaștere pentru enzimă, pot exista un număr relativ mare și variabil de alte nucleotide, neimplicate în acest proces. Modificarea prin metilare a centrilor  $sB_1$  și  $sB_2$  ar împiedica „plimbarea” moleculelor enzimatică de-a lungul moleculei de DNA.

### III.3.3. Sisteme *R-M* de tip III

Din această grupă de sisteme *R-M* pentru moment s-au semnalat doar două enzime de restricție, codificate de bacteriofagul  $P_1$  și plasmida  $P_{15}$  din *E. coli*. Acestea își exercită acțiunea în prezența ATP și  $Mg^{2+}$  și sînt doar stimulate de SAM și nu total dependente de acesta. În plus, endonucleazele de restricție de tip III (identificate de Kauc și Piekarowicz, 1978) diferă de cele de tip I și prin aceea că nu induc o hidroliză masivă de ATP în cursul restricției și nici nu formează complecși specifici DNA-enzimă care să poată fi reținuți pe filtre de nitroceluloză. Pe de altă parte, aceste enzime dau prin hidroliză fragmente bine definite de DNA, ceea ce este caracteristic enzimelor de restricție de tip II.

În ultima vreme, Baechi și colab. (1979) au adus lămuriri și asupra centrului de recunoaștere și metilare al sistemului *R-M* de tip Eco  $P_1$  (codificat de către bacteriofagul  $P_1$  în *E. coli* lizogen). Ca substrat s-a utilizat DNA de SV40. S-a constatat că enzima hidrolizează macromolecula de DNA la o distanță de 25—27 perechi de baze de situsul de recunoaștere și metilare A-G-A-C-C, în direcția 3', cu o variație de 2—4 perechi de baze. *In vitro*, enzima metilează doar o singură catenă, ceea ce este în concordanță cu asimetria centrului de recunoaștere. Unele variante de DNA de SV40 mai capătă cîte un centru de rupere pentru Eco  $P_1$ , prin trecerea unei secvențe A-G-A-A-C în A-G-A-C-C.

### Bibliografie

1. Arber, W., *Pathol. Microbiol.* 14, 127 (1962).
2. Arber, W., *J. Mol. Biol.*, 11, 247 (1965).
3. Arber, W., *Trends Biochem. Sci.*, august (1977).
4. Arber, W., *Angew. Chem.*, 17, 73 (1978).



5. Arber, W., Dussoix D., *J. Mol. Biol.*, **5**, 18 (1962).
6. Arber, W., Kühnlein U., *Pathol. Microbiol.*, **30**, 946 (1967).
7. Arber, W., Linn, S., *Annu. Rev. Biochem.*, **38**, 467 (1969).
8. Arber, W., Yuan, R., Hickie, T.A., *FEBS Meet. Proc.*, (publ. 1975), p. 3 (1974).
9. Daechi, B., Reiser, J., Pirrotta V., *J. Mol. Biol.*, **128**, 143 (1979).
10. Bertani, G., Weigle, J.J., *J. Bacteriol.*, **64**, 357 (1953).
11. Bigger, A.H., Murray, K., Murray, N.E., *Nature New Biol.*, **244**, 7 (1973).
12. Boyer, H.W., *J. Bacteriol.*, **88**, 1652 (1974).
13. Boyer, H.W., *Annu. Rev. Bacteriol.*, **25**, 153 (1971).
14. Boyer, H.W., Chow, L.T., Dugaiczky, A., Hedgpeth, J., Goodman, H.M., *Nature New Biol.*, **244**, 40 (1973).
15. Boyer, H.W., Greene, P.J., Meagher, R.B., Betlach, M.C., Russell, D., Goodman, H.M., *FEBS Meet. Proc.*, (publ. 1975), p. 23 (1974).
16. Brown, N.L., Smith, M., *FEBS Lett.*, **65**, 284 (1976).
17. Danna, K.J., Nathans, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **68**, 2913 (1971).
18. Dugaiczky, A., Hedgpeth, J., Boyer, H.W., Goodman, H.M., *Biochemistry*, **13**, 503 (1974).
19. Dussoix, D., Arber, W., *J. Mol. Biol.*, **5**, 37 (1962).
20. Engberg, J., Klenow, H., *Trends Biochem. Sci.*, august (1977).
21. Garfin, D.E., Goodman, H.M., *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **59**, 108 (1974).
22. Glover, S., Schell, J., Symonds, N., Stacey, K.A., *Genet. Res.*, **4**, 480 (1963).
23. Gough, M., Lederberg, S., *J. Bacteriol.*, **91**, 1460 (1966).
24. Greene, P.J., Betlach, M.C., Goodman, H.M., Boyer, H.W., in „*Methods in molecular biology*“, ed. R.B. Wickner, Marcel Dekker Inc., New York (1974).
25. Hartman, M., Zinder, N.D., *J. Mol. Biol.*, **85**, 345 (1974).
26. Hedgpeth, J., Goodman, H.M., Boyer H.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3448 (1972).
27. Horiuchi, K., Zinder, N.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3220 (1972).
28. Kauc, L., Piekarowicz, A., *Eur. J. Biochem.*, **92**, 417 (1978).
29. Kelly, T.J., Smith, H.O., *J. Mol. Biol.*, **51**, 393 (1970).
30. Kleid, D., Humayun, Z., Jeffrey A., Ptashne M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **73**, 293 (1976).
31. Koncz, Cs., Kiss, A., Venetianer P., *Eur. J. Biochem.*, **89**, 523 (1978).
32. Kühnlein, U., Arber, W., *J. Mol. Biol.*, **63**, 1 (1972).
33. Lacks, S., Greenberg, B., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4060 (1973).
34. Linn, S., Lautenberger, J.A., Eskin, B., Lacky, D., *Fed. Proc.*, **33**, 1128 (1974).
35. Linn, S., Arber, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **59**, 1300 (1968).
36. Luria, S.E., Human, M.L., *J. Mol. Biol.*, **5**, 37 (1952).
37. Mamelak, L., Boyer, H.W., *J. Bacteriol.*, **91**, 1460 (1970).
38. Meselson, M., Yuan, R., Heywood, J., *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 447 (1972).
39. Meselson, M., Yuan, R., *Nature*, **217**, 1110 (1968).
40. Middleton, J.H., Edgell, M.H., Hutchinson C.A., *J. Virol.*, **10**, 42 (1972).
41. Modrich, P., Zabel, D., *J. Biol. Chem.*, **251**, 5866 (1976).
42. Murray, K., Hughes, S.G., Brown, J.S., Bruce, S.A., *Biochem. J.*, **156**, 317 (1976).
43. Old, R., Murray, K., Roizes, G., *J. Mol. Biol.*, **92**, 331 (1975).
44. Pittard, J., *J. Bacteriol.*, **87**, 1256 (1964).
45. Polisky, B., Greene, P.J., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M., Boyer, H.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **72**, 3310 (1975).
46. Ravetch, J.V., Horiuchi, K., Zinder, N.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **75**, 2266 (1978).
47. Roberts, R.J., in „*Recombinant molecules: impact on science and society*“, ed. R.F. Beers jr. & E.G. Hassel, Raven Press, New York (1978).
48. Roberts, R.J., *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.*, **4**, 123 (1976).
49. Roberts, R.J., Breitmayer, J.B., Tabachnik, N.F., Myers P.A., *J. Mol. Biol.*, **91**, 121 (1975).
50. Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A., Murray, K., *J. Mol. Biol.*, **102**, 157 (1976a).

51. Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A., Murray, K., *J. Mol. Biol.*, **103**, 199 (1976b).
52. Roulland-Dussoix, D., Yoshimori, R., Greene, P.J., Betlach, M.C., Goodman, H.M., Boyer, H.W., in „*Bacterial plasmid conference*“ (Am. Soc. Microbiol.) (1974).
53. Roy, P.H., Smith, H.O., *J. Mol. Biol.*, **81**, 445 (1973).
54. Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J., *Biochemistry*, **12**, 3055 (1973).
55. Shulman, M.J., *Nature*, **252**, 76 (1974).
56. Smith, D.J., Arber, W., Kühnlein, U., *J. Mol. Biol.*, **63**, 9 (1972).
57. Smith, D.J., Blattner, F.R., Davies, J., *Nucleic Acids Res.*, **3**, 343 (1976).
58. Smith, H.O., Wilcox, K.W., *J. Mol. Biol.*, **51**, 379 (1970).
59. Smith, L.A., Chirikjan, J.G., *J. Biol. Chem.*, **254**, 1003 (1979).
60. Smith, H.O., Nathans, D., *J. Mol. Biol.*, **81**, 419 (1973).
61. Subramanian, N.K., Pan, J., Zain, S., Weissman, S.M., *Nucleic Acids Res.*, **1**, 3123 (1974).
62. Tiollais, P., Rambach, A., *La Recherche*, **82**, 821 (1977).
63. Vovis, G.F., Horiuchi, K., Hartman, N., Zinder, N.D., *Nature New Biol.*, **246**, 13 (1973).
64. Watanabe, T., Nishida, H., *Med. Biol.*, **67**, 96 (1963).
65. Watson, J.D., Crick, F.C.H., *Nature*, **171**, 737 (1953).
66. Weiss, B., Richardson, C.C., *J. Mol. Biol.*, **23**, 405 (1967).
67. Wood, W.B., *J. Mol. Biol.*, **16**, 118 (1966).
68. Yoshimori, R., Roulland-Dussoix, D., Boyer, H.W., *J. Bacteriol.* **112**, 1275 (1972).
69. Yuan, R., Reiser, J., *J. Mol. Biol.*, **122**, 433 (1978).



## IV. DNA-ligazele

Introducerea „pasagerului” în „vehicul”, cu alte cuvinte „lipirea” genei de interes într-un anumit loc din replicon, a devenit posibilă datorită utilizării în practica de laborator a noi „instrumente” de lucru și anume endonucleazele de restricție — care taie DNA-vehicul în locuri bine determinate (v. cap. „Enzimele de restricție”) — și a enzimelor numite polinucleotidsintetaze sau, mai simplu, *DNA-ligaze* — care sudază covalent fragmentele de DNA. În general, *sintetazele* sau *ligazele* sînt enzime care catalizează reacții de sinteză, folosind energia eliberată prin scindarea hidrolitică a unor legături macroergice.

DNA ligazele (întîlnite în literatura de specialitate și ca *sealases* sau *DNA joining enzymes*) catalizează formarea unor legături covalente fosfodiesterice între capetele 3'-hidroxil și 5'-fosfat ale unor fragmente de DNA dublu catenar, concomitent cu ruperea unor legături pirofosforice din  $\text{NAD}^+$  sau din ATP, ca furnizori de energie.

Impulsul pentru studiul acestor enzime a fost imprimat de două fapte experimentale observate la începutul deceniului al șaptelea al secolului nostru și anume: 1) Meselson și Weigle (1961), precum și Kellenberg și colab. (1961) au arătat că recombinația genetică are loc prin ruperea și relegarea moleculelor de DNA; 2) Young și Sinsheimer (1964), pe de o parte, și Bode și Kaiser (1965), pe de altă parte, au constatat că după ce bacteriofagul  $\lambda$  infectează bacteria *E. coli* o mare parte din DNA-ul său liniar este convertit într-un duplex de tip CCI (cerc covalent închis). Aceste fapte au sugerat că în celulă trebuie să existe un mecanism de legare enzimatică a lanțurilor polideoxiribonucleotidice.

În 1967 a avut loc, independent și aproape simultan în nu mai puțin de cinci laboratoare (Cozzarelli și colab., 1967; Geffer și colab., 1967; Gellert, 1967; Olivera și Lehman, 1967; Weiss și Richardson, 1967), descoperirea enzimelor implicate în procesele amintite mai sus, anume a DNA-ligazelor, în celulele de *E. coli* neinfectate sau infectate cu bacteriofagul T4. Identificarea acestor enzime a coincis și cu ipoteza făcută de Okazaki și colab. (1968), pentru un mecanism de repli-

care discontinuează a DNA, prin fragmente scurte, care se unesc ulterior cu formarea unui lanț continuu. Odată cu acceptarea acestui model de replicare a fost recunoscut definitiv rolul DNA ligazei ca parte integrantă a mecanismelor de replicare celulară.

După descoperirea ligazelor în celulele de *E. coli* neinfectate și infectate cu bacteriofagi, activități similare de legare a fragmentelor de DNA (la capetele 3'-hidroxil și 5'-fosfat) au mai fost observate într-o mare varietate de țesuturi de organisme eucariote. Astfel, Lindhal și Edelman (1968) au pus în evidență activitatea DNA ligazică în splina, timusul și măduva osoasă de iepure, Tsukada și Ichimura (1971) în ficatul de șobolan, în timp ce Howell și Stern (1971) au identificat această activitate în microsporocitele de crin. De asemenea, activitatea DNA ligazică a fost detectată la virusul sarcomului Rous de către Mizutani și colab. (1971), precum și în extractele celulare cu o creștere rapidă. Lindhal a găsit un înalt nivel de activitate DNA ligazică în extractele de splină de porc, oaie sau vițel, precum și în mieloame murine (Lindhal, 1971). Aceste date arată larga răspândire a DNA-ligazelor în organismele eucariote și procariote.

La ora actuală, ligazele cele mai bine caracterizate și care au găsit o largă utilizare în tehnologia DNA recombinant sînt cele de natură bacteriană, izolate din tulpini de *E. coli*, neinfectate și infectate cu bacteriofagul T4. Ambele enzime au putut fi obținute în cantități suficiente și sub formă omogenă. Amîndouă aceste ligaze catalizează sinteza unor legături fosfodiesterice între capete cu grupări 3'-hidroxil și 5'-fosfat adiacente, din duplexul de DNA. Asupra acestor enzime ne vom opri pe larg în cele ce urmează.

Din punctul de vedere al clasificării lor conform normelor stabilite de către Comisia de Enzimologie a Uniunii Internaționale de Biochimie (I.U.B.), DNA-ligazele sînt codificate ca subclasa E.C.6.5., adică ligaze care formează legături de tip P-O.

#### IV.1. Mecanismul de acțiune

Sinteza legăturii fosfodiesterice într-un duplex de DNA care are o catenă crestată (*nicked*) are loc, indiferent de tipul de ligază implicat — cea din *E. coli* neinfectată sau cea indusă în *E. coli* de infecția cu bacteriofag T4 — printr-o reacție cu trei etape, care implică formarea a doi compuși intermediari covalenți (fig. 21).

În cazul DNA-ligazei din *E. coli* infectată cu bacteriofag T4 — pe scurt T4 ligaza — prima etapă a reacției constă din interacțiunea enzimei cu ATP, ca furnizor de energie și donor de grupări adenil. În urma acestei interacțiuni se formează adenilatligaza și acidul pirofosforic ( $PP_i$ ). În etapa următoare, gruparea adenil este transferată la DNA, obținîndu-se



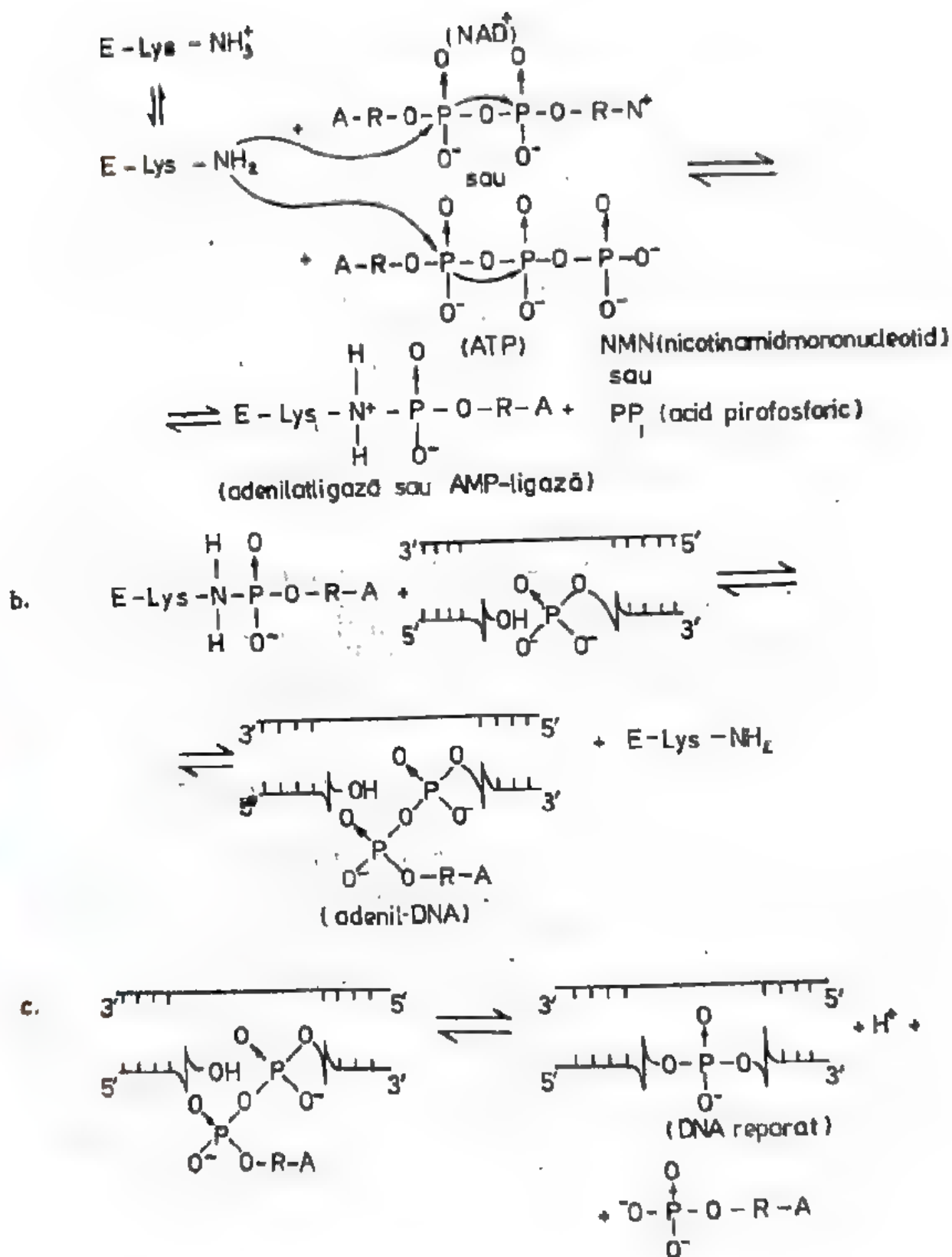
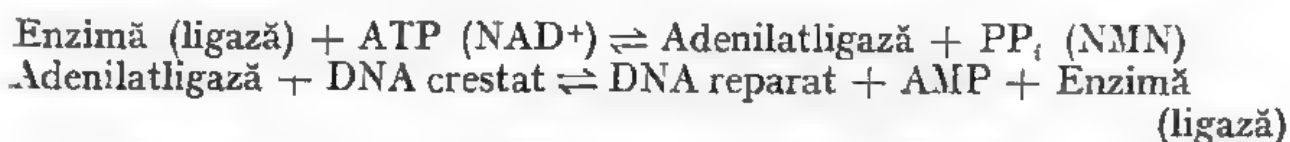


Fig. 21. Mecanismul de acțiune al DNA-ligazelor: a) formarea adenilatligazei (enzima activă); b) formarea adenil-DNA; c) formarea legăturii fosfodiesterice (după Modrich și Lehman, 1973).

o legătură nouă, de tip pirofosfat, între AMP și gruparea 5'-fosfat terminală a creștăturii. În final, 5'-fosfatul este atacat de către gruparea 3'-hidroxil adiacentă, constituindu-se legătura fosfodiesterică, iar concomitent se elimină și AMP. Aceeași secvență de reacții o catalizează și DNA-ligaza din *E. coli*, dar în acest caz energia necesară desfășurării procesului, precum și gruparea adenil, se obțin prin hidroliza unei legături macroergice din  $\text{NAD}^+$  și, ca urmare, produsul secundar de reacție care se elimină este nicotinamidnucleotidul (NMN) în loc de  $\text{PP}_i$ . De menționat că aceasta a fost prima reacție în care s-a pus în evidență participarea neoxidativă a  $\text{NAD}^+$ , utilizat drept cofactor la formarea legăturilor fosfodiesterice (Zimmerman și colab., 1967).

Schematic, reacția de formare a legăturilor fosfodiesterice poate fi rezumată astfel:



Pentru mecanismul propus pledează mai multe dovezi experimentale și anume: izolarea produșilor intermediari covalenți, desfășurarea reacției în sens invers, precum și analiza cineticii de reacție.

#### IV.1.1. Izolarea produșilor intermediari

Adenilatligaza este un intermediar obligatoriu în repararea „creștăturilor” existente într-o singură catenă a duplexului de DNA, indiferent de tipul de enzimă care participă la acest proces sau de cofactor (fig. 21). Mai mult chiar, complexul AMP-ligază, care este foarte stabil, se poate forma și în absența DNA. Odată format, complexul activ poate fi izolat prin gel-filtrare și poate fi utilizat ca atare pentru repararea creștăturilor DNA, nemaifiind nevoie în acest caz de prezența unui donor de energie suplimentar. În reacție se pune în libertate AMP, după cum au arătat Olivera și Lehman (1968) în cazul ligazei din *E. coli*.

De asemenea, s-a dovedit că adenilatligaza incubată cu NMN sau  $\text{PP}_i$  determină regenerarea  $\text{NAD}^+$  și, respectiv, a ATP (Olivera și Lehman, 1968; Weiss și colab., 1968).

Toate aceste fapte experimentale sînt compatibile cu participarea adenilatligazei la reacția de sinteză a legăturilor fosfodiesterice.

Studiul structurii complexului activat — adenilatligaza — realizat de către Gumpert și Lehman (1971) a precizat că între enzimă și AMP se formează o legătură fosfodiamidică, prin atacul nucleofil al grupării  $\epsilon$ -amino a lizinei din constituția ligazei asupra grupării fosforice a AMP



(fig. 22). Acest tip de complex s-a pus în evidență atât pentru DNA-ligaza din celulele neinfectate de *E. coli*, cât și pentru DNA-ligaza inclusă de bacteriofagul T4 în celulele de *E. coli*. Ca atare aceste două ligaze au

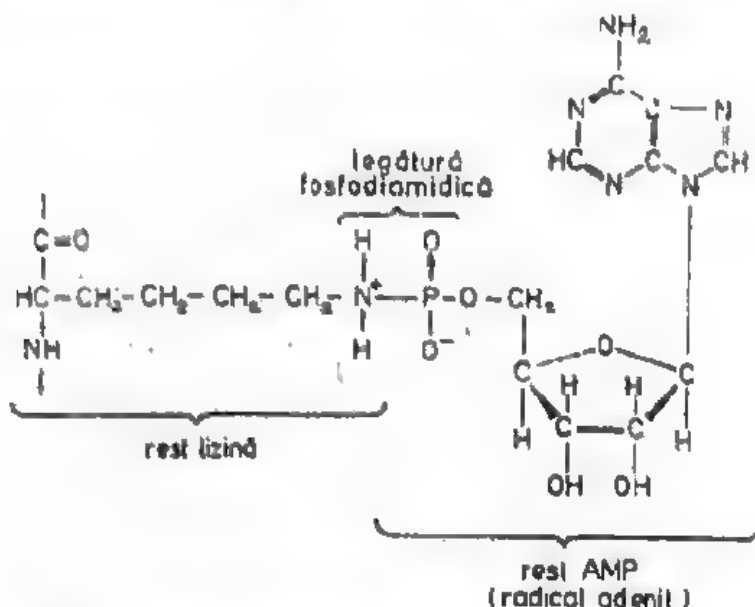


Fig. 22. Structura complexului activat adenilat-ligază, prin legarea grupării  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> a lizinei din ligază cu restul fosfat din AMP.

un comportament unic în rândul enzimelor, folosind gruparea  $\epsilon$ -amino a lizinei drept reactant nucleofil în cursul unei reacții enzimactice cu transfer de grupare nucleotidil.

Identificarea legăturii fosfodiamicice (fig. 22) s-a făcut după izolarea unui compus intermediar, labil în mediu acid și stabil în mediu alcalin și care este susceptibil la rupere cu hidroxilamină în mediu acid. Această comportare face ca legătura fosfodiamică să se deosebească de alte tipuri de legături care s-ar putea forma între enzimă și restul de AMP, cum ar fi cea fosfodiestică sau cea de anhidridă mixtă.

Cel de al doilea intermediar covalent, adenil-DNA (fig. 21), se formează prin legarea restului de AMP din adenilatligază la capătul 5'-fosfat al creștăturii, concomitent cu apariția unei legături de tip pirofosfat. În condiții de stare staționară acest complex nu se acumulează, dar dacă se lucrează cu un exces de enzimă la 0°C după o incubare de scurtă durată (30 secunde) cu NAD<sup>+</sup>, respectiv ATP, se poate izola o mică cantitate din acest compus (Olivera și colab., 1968; Wang, 1971). Complexul adenil-DNA a mai putut fi obținut și prin reacția inversă, pornind direct de la AMP și DNA (fig. 20). Dacă adenil-DNA reacționează cu capătul 3'-hidroxil al catenei neadenilate din creștătura DNA se formează legături fosfodiesterice în absența substanțelor macroergice și se eliberează AMP.

Pentru identificarea tipului de legătură prin care se formează complexul adenil-DNA, acesta a fost denaturat și tratat apoi cu exonuclează I

(Olivera și colab., 1968). Se știe că această enzimă degradează DNA monocatenar în mod secvențial, începând cu capătul 3'-hidroxil, cu formare de 5'-mononucleotide și a unui dinucleotid, corespunzător capătului 5'-terminal al catenei analizate. Între produșii reacției de hidroliză a adenil-DNA denaturat s-a izolat și un trinucleotid care avea AMP legat 5'. De aici s-a tras concluzia că AMP este mai degrabă legat de DNA prin intermediul unei legături pirofosfat la capătul 5'-fosfat, decât ca fosfodiester la capătul 3'-hidroxil.

În sprijinul presupunerii că adenil-DNA este direct implicat în reacția ligazică și că în complex se formează o legătură de tip pirofosforic vin și lucrările cu polideoxiribonucleotide sintetice de tip poli(dT). Astfel, dacă poli(dA)<sub>5000</sub> se incubează cu adenilpoli(dT)<sub>200</sub> marcat cu tritiiu la AMP ([<sup>3</sup>H]-AMP) și cu <sup>32</sup>P la restul polinucleotidic (5'-[<sup>32</sup>P]-poli(dT)) în prezența DNA-ligazei din *E. coli* se produce eliberarea stoichiometrică a [<sup>3</sup>H]-AMP și incorporarea <sup>32</sup>P în legătura fosfodiesterică (fig. 23). Prezența NAD<sup>+</sup> în această reacție provoacă o puternică inhibiție a formării legăturilor fosfodiesterice, cu trecerea enzimei sub forma de adenilatligază (Harvey și colab., 1971). Rezultate similare s-au obținut și cu DNA-ligaza indusă de bacteriofagul T4.

Formarea unei legături pirofosforice la capătul 5'-fosfat al leziunii din catena DNA nu înseamnă în mod automat implicarea sa într-o

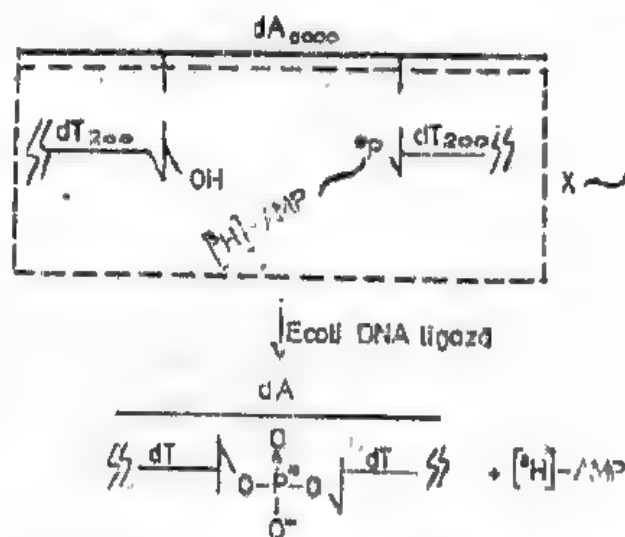


Fig. 23. Sinteza legăturii diesterice și eliberarea AMP din poli(dT)-adenil, pus în prezența poli(dA) și a DNA-ligazei din *E. coli* (după Lehman, 1974).

reacție de tip ligazică, aceasta deoarece DNA-ligazele manifestă o specificitate ridicată pentru restul de adenină existent în intermediarul covalent adenil-DNA (Olivera și Lehman, 1968). Mai mult chiar, Harvey și colab. (1971) au arătat că înlocuirea AMP cu dAMP reduce la 10% activitatea enzimei din *E. coli* infectată cu T4, iar GMP s-a dovedit cu totul inefficient în această reacție.



#### IV.1.2. Desfășurarea reacției inverse

Studiul mecanismului de reacție al DNA ligazelor a sugerat că, în reacția inversă, ele s-ar putea comporta ca niște endonucleaze AMP-dependente, adică odată ce ligaza determină formarea legăturilor fosfodiesterice înseamnă că ea ar putea să catalizeze la fel de bine și ruperea lor, iar cele două activități ale sale — de scindare și de legare — se vor manifesta în funcție de condițiile în care este pusă să lucreze.

Această comportare a fost postulată de către Wang (1971), pentru a putea explica modul de acțiune al proteinei  $\omega$  din celulele de *E. coli*, avind proprietatea să provoace desrăsucirea duplexului negativ superîncolăcit de DNA în conformația CCI.

Atât activitatea endonucleazică AMP-dependentă, cât și relaxarea superhelixului s-a dovedit a fi chiar o măsură a reversibilității reacției ligazice.

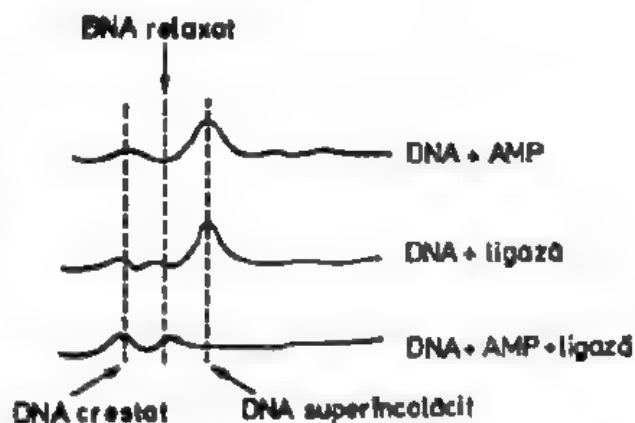
Experiențele au arătat într-adevăr că moleculele CCI de DNA din bacteriofagul  $\lambda$  incubate cu ligază și AMP dau naștere la molecule noi, cu două conformații diferite:

- molecule circulare deschise (CD), cu o singură creastă, numai pe o singură catenă;
- molecule CCI care s-au relaxat, pierzându-și starea de superîncolăcire.

Aceste forme moleculare s-au pus în evidență prin ultracentrifugare în gradient de CsCl a moleculelor CCI incubate în prezența ligazei și a AMP (fig. 24).

Viteza reacției inverse este foarte mică, iar punerea ei în evidență se face numai în prezența unor cantități mari de enzimă. Folosirea

Fig. 24. Conversia AMP-dependentă a DNA superîncolăcit din bacteriofagul  $\lambda$  la forma relaxată și crestată sub acțiunea DNA-ligazei (după Modrich și colab., 1972).



$^{32}\text{P}$ -AMP permite identificarea adenil-DNA și a adenilatligazei, produși intermediari care apar și în reacția inversă, ceea ce aduce noi argumente în favoarea mecanismului de reacție prezentat anterior (fig. 21).

Relaxarea sub acțiunea ligazelor a DNA superîncolăcit diferă de relaxarea catalizată de proteina  $\omega$ , amintită mai sus, din mai multe puncte de vedere, cel mai important fiind însă dependența absolută a

reacției de prezența AMP. De asemenea, mai există diferențe de specificitate și de cinetică enzimatică: ligaza relaxează atât DNA superîncolăcit spre dreapta (notat convențional cu semnul (—)), cât și pe cel superîncolăcit spre stînga (notat cu (+)), în timp ce proteina  $\omega$  este inactivă față de superîncolăcirea spre stînga (+) (Wang, 1971).

### IV.1.3. Analiza cineticii stării staționare

Izolarea celor doi produși intermediari covalenți din reacția ligazică — adenilatligaza și adenil-DNA — care apar atât în reacția directă, cât și în cea inversă — confirmă, odată în plus, implicarea lor în sinteza legăturilor fosfodiesterice. Totuși, dovada directă a participării lor la acest proces presupune ca cele două constante de viteză (a formării lor, precum și a reacției următoare (fig. 20) să fie egale sau mai mari decât viteza sintezei legăturii fosfodiesterice. Adică, adenilatligaza și adenil-DNA să constituie intermediari semnificativi din punct de vedere cinetic.

Rezultatele analizei cinetice a stării staționare a reacției ligazice globale sînt date în tabelul 6. Legarea a fost măsurată cu ajutorul unui polideoxiribonucleotid sintetic de tip  $(dA)_{5000} \cdot (dT)_{200}$ , în care fragmentele de poli(dT) scurte sînt legate prin punți de hidrogen la lanțul poli(dA), care este mult mai lung.

Tabelul 6

Constantele de viteză ale reacțiilor catalizate de *E. coli* ligază (după Lehman, 1974)

Reacția	$NH_4^+$	Turnover ( $\text{min}^{-1}$ )
DNA crestat + $NAD^+ \rightleftharpoons$	—	1,4
DNA reparat + AMP + NMN	+	28,0
ligază + $NAD^+ \rightleftharpoons$	—	60,0
adenilatligază + NMN	+	60,0
adenil-DNA $\rightleftharpoons$	—	9,1
DNA reparat + AMP	+	10,0

Reacția controlată de ligaza din *E. coli* este potențată în mod specific de către concentrațiile mici de ioni  $NH_4^+$  (1 mM). La o concentrație de saturare (5–10 mM  $NH_4^+$ ), viteza reală maximă ( $V_{\text{max}}$ ) crește de aproape 20 de ori față de viteza de reacție în absența acestor ioni. În aceste condiții  $K_M$  pentru  $NAD^+$  s-a determinat a fi de 7  $\mu\text{M}$ ;  $K_M$  pentru creștăturile monocatenare are o valoare de 0,04–0,06  $\mu\text{M}$ ; iar turnover-ul se stabilește la 28 legături fosfodiesterice pe minut (Modrich și Lehman, 1973). Spre deosebire de DNA-ligaza din *E. coli*, care este



puternic activată de ioni  $\text{NH}_4^+$ , activitatea DNA-ligazei T4 nu este afectată de concentrații de ioni  $\text{NH}_4^+$  până la 10 mM.

Viteza de formare a adenilatligazei, măsurată prin schimb izotopic între restul de NMN marcat cu tritiiu (din  $\text{NAD}^+$  marcat) și  $\text{NAD}^+$  nemarcat este mai mare decât viteza de formare a legăturilor fosfodiesterice, care unesc marginile creștăturilor monocatenare din DNA; deci, adenilatligaza se poate forma cu o viteză suficient de mare pentru a putea fi regăsită ca produs intermediar în reacția globală. Viteza reacțiilor parțiale nu este afectată de către ioni  $\text{NH}_4^+$ , ceea ce arată că activitatea are loc într-un moment situat după formarea adenilatligazei. O dovadă suplimentară a participării directe a adenilatligazei la sinteza legăturilor fosfodiesterice provine de la observația că reacția de legare urmează o cinetică de tip „ping-pong”, după cum reiese din reprezentarea inversului vitezei în funcție de concentrația substratului (Modrich și Lehman, 1973) (fig. 25). Cea mai simplă interpretare a aspectului curbelor care prezintă aceeași pantă prevede o succesiune de reacții parțiale cu formarea intermediară a unor complecși sau a unor compuși covalenți ai enzimei cu grupări care trebuie transferate; în cazul de față adenilatligaza este complexul implicat.

Întrucât reacția de formare a adenilatligazei este ușor reversibilă este de presupus că o parte semnificativă a energiei libere a legăturilor pirofosforice din  $\text{NAD}^+$  este reținută în intermediarul adenilat, ceea ce, de altfel, corespunde cu existența în acest compus covalent a unei legă-

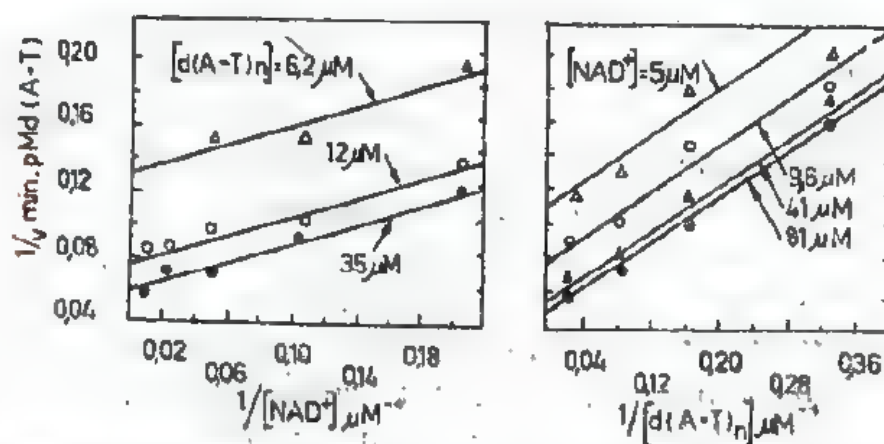


Fig. 25. Cinetica pe două substraturi a DNA-ligazei din *E. coli* (după Modrich și Lehman, 1973).

turi fosfodiamidice macroergice, care leagă restul adenil de enzimă, prin intermediul grupărilor  $\epsilon\text{-NH}_2$  ale lizinei. Constanta de echilibru determinată pentru formarea adenilatligazei în condiții standard de reacție, adică la  $30^\circ\text{C}$  și  $\text{pH}$  8,0, a fost 28. Deoarece concentrația intracelulară a  $\text{NAD}^+$  din *E. coli* este cca 0,5 mM (London și Knight, 1966), constanta de echilibru amintită sugerează că întreaga cantitate de ligază celulară ar fi sub formă activată, de adenilatligază.

Încercările întreprinse pentru a izola cea de a doua reacție din secvența de trei cîte cuprinde procesul de formare a legăturilor fosfodiesterice — este vorba de transferul AMP din adenilatligază la DNA și de determinarea constantei sale de viteză — au generat doar eșecuri. Deși, în condiții speciale de lucru —  $0^{\circ}\text{C}$  și  $\text{pH } 5,6$  — adenil-DNA se poate izola în cursul reacției catalizată de DNA-ligaza T4 (Harvey și colab., 1971), totuși parametrii cinetici obținuți din aceste măsurători nu pot fi extrapolați pentru reacția ligazică propriu-zisă, care are loc la un  $\text{pH}$  și la o temperatură optime.

Pentru a bloca secvența reacțiilor ligazice la stadiul formării adenil-DNA este necesar să se folosească drept substrat un DNA crestat în care să lipsească complet gruparea 3'-hidroxil, care este esențială pentru formarea legăturilor fosfodiesterice. În prezența unui astfel de DNA reacția nu poate decurge mai departe de starea de activare a capătului 5'-fosfat, fapt dovedit de cercetări efectuate pe polinucleotide cu structură specifică. S-a lucrat pe un substrat sintetic cu perechi homopolimerice de tip  $(\text{dA})_{5000} \cdot (\text{dT})_{200}$ , în care lanțurile  $(\text{dT})_{200}$  aveau capete 3'-dideoxitimidilat. S-a constatat că viteza sintezei adenilat-DNA a fost foarte mică, în comparație cu viteza de legare a  $(\text{dT})_{200}$  cu grupări 3'-hidroxil. De aici s-a dedus concluzia că adenil-DNA este un intermediar obligatoriu în reacția catalizată de DNA-ligaze, iar grupările 3'-hidroxil sînt deosebit de importante chiar și pentru adenilarea grupărilor 5'-fosfat adiacente crestaturii.

Viteza de eliberare a AMP dintr-un adenil-DNA sintetic — și anume din poli $(\text{dT})_{200}$ -adenilat — și deci viteza celei de a treia etape a reacției ligazice (fig. 21, c) este mai mare decît viteza reacției globale, măsurată în absența ionilor  $\text{NH}_4^+$ , ceea ce duce la implicarea directă a adenil-DNA în sinteza legăturilor fosfodiesterice. Totuși, în condiții optime pentru activitatea ligazică, ceea ce presupune prezența ionilor  $\text{NH}_4^+$ , viteza de formare a AMP din adenil-DNA este semnificativ mai mică decît viteza reacției globale. Pentru moment nu există încă o explicație satisfăcătoare pentru această anomalie, dar s-ar putea ca determinarea constantei de viteză a acestei reacții parțiale în prezența ionilor  $\text{NH}_4^+$  să ofere o alternativă interpretabilă.

Incubarea adenil-DNA cu ligază poate duce fie la sinteza legăturilor fosfodiesterice și la eliberarea AMP, fie la reacția inversă, de reformare a adenilatligazei, precum și a DNA cu creastătură monocatenară. Adenilatligaza liberă nu duce la eliberarea AMP din adenil-DNA (Hall și Lehman, 1969); dacă rolul ionului  $\text{NH}_4^+$  ar consta în ușurarea disocierii adenilatligazei de pe DNA, s-ar produce implicit și inactivarea unei părți a enzimei. Într-adevăr, dacă adenil-DNA se incubează cu ligază și cu NMN în absența ionilor  $\text{NH}_4^+$ , întreaga cantitate de AMP se regă-



sește ca atare, liberă, deși se recuperează și o parte semnificativă a  $\text{NAD}^+$  (cca 20%). De aici se poate trage concluzia că ionii  $\text{NH}_4^+$  facilitează disocierea adenilatligazei de pe DNA; această disociere ar trebui să explice și constanta de viteză anormal de mică în reacția de formare a AMP din adenil-DNA în prezența ionilor  $\text{NH}_4^+$ . O altă explicație, neconfirmată deocamdată, ar fi aceea că pentru legarea la adenil-DNA a ligazei neadenilate sînt necesare modificări conformaționale lente ale enzimei. Disocierea ligazei de pe adenil-DNA s-ar putea să nu decurgă normal înainte ca acest produs intermediar covalent să fie convertit la produșii finali, AMP și DNA cu creștătura din duplex reparată. Ca urmare, s-ar putea ca, lucrîndu-se cu un adenil-DNA sintetic incubat cu ligază, să apară o fază de legare lentă, care nu se produce atunci cînd enzima acționează în condiții catalitice normale și optime.

În ciuda acestor incertitudini, rezultatele cinetice — luate în ansamblu — corespund mecanismului propus pentru reacția ligazică, iar dovada că atât adenilatligaza, cît și adenil-DNA se acumulează în cursul reacției inverse oferă un sprijin suplimentar pentru mecanismul propus.

## IV.2. Specificitatea de substrat a DNA-ligazelor

Din prezentarea mecanismului reacției ligazice (fig. 21) a reieșit că pentru desfășurarea ei este necesară prezența unei creștături cu capete 3'-hidroxil și 5'-fosfat pe una din catenele duplexului de DNA, fără ca în urma schimbării să fie îndepărtat vreun nucleotid, deci capetele trebuie să rămîină adiacente. Fig. 26 rezumă cîteva din situațiile în care se poate găsi ligaza față de un DNA cu întreruperi într-unul din lanțurile polinucleotidice. Or, din cele cinci situații arătate, numai cazul V este singurul care îndeplinește cerințele necesare pentru ca ligaza să-și exercite acțiunea. Weiss și colab. (1968) au arătat că natura bazelor azotate care mărginesc creștătura nu are nici o importanță și că reacția ligazică este independentă de acest factor.

La începutul capitoului s-a arătat că DNA-ligaza din *E. coli* și cea indusă de bacteriofagul T4 în celulele de *E. coli* infectate au cerințe diferite în ceea ce privește cofactorul participant la reacția ligazică în calitate de furnizor de energie și donor de grupări adenil. Dar deosebiriile dintre cele două enzime nu se opresc aici: ele prezintă și specificitate de substrat diferită. S-a stabilit că T4 DNA-ligaza — dar nu și *E. coli* DNA-ligaza — poate cataliza legarea nu numai a oligodeoxiribonucleotidelor, ci și a oligoribonucleotidelor în duplexurile hibride RNA-DNA (Fareed și colab., 1971; Kleppe și colab., 1970; Olivera și Lehman, 1968); de asemenea, tot numai DNA-ligaza T4 are proprietatea de a

îndeplini legarea cap-la-cap (*end-to-end*) a două duplexuri de DNA cu capete netede, necoezive (capete cu perechi complete de baze; tocite == *blunt* sau *flush ends*) (Sgaramella și colab., 1970).

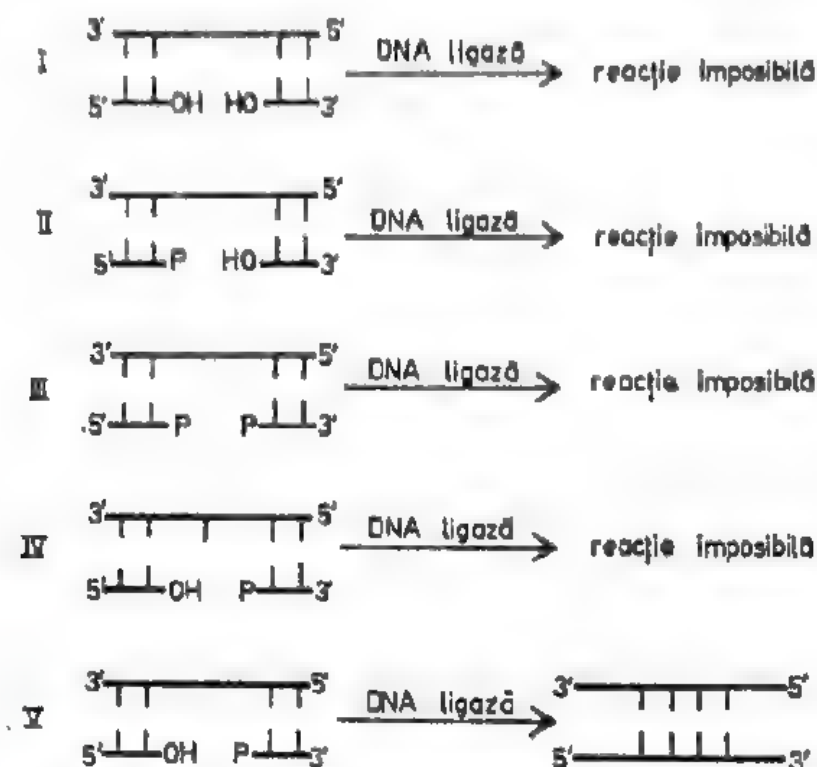


Fig. 26. Specificitatea de acțiune a DNA-ligazei pentru capetele 3'-hidroxil și 5'-fosfat adiacente.

Primele încercări de legare cu DNA-ligaza *T4* făcute pe fragmente cu capete „tocite” de DNA dublu catenar, s-au soldat cu randamente extrem de scăzute, deoarece era necesar ca porțiunile terminale ale celor două capete ce urmau a fi legate să fie neapărat adiacente, ceea ce în soluție, spontan, se petrece cu o probabilitate foarte mică.

Pe de altă parte, lucrări recente ale lui Sgaramella și colab. (1977) și Sgaramella și Ehrlich (1978) au arătat că randamentul de circularizare a unor fragmente de DNA cu capete tocite (obținute în urma hidrolizei cu diverse enzime de restricție), prin acțiunea *T4* ligazei, variază în limite foarte largi (tabelul 7). Autorii presupun că dispersia rezultatelor s-ar putea datora lungimii diferite a segmentelor de DNA. Rezultatele arată că fragmentele mici se circularizează cu randament mai mare decât fragmentele lungi. Aceasta înseamnă că probabilitatea așezării capetelor în poziție adiacentă convenabilă acțiunii ligazei este mai mare la fragmentele mici.

În general însă, în cazul legării unor capete netede, pentru realizarea unei legături eficiente, cu randament crescut, era necesară găsirea soluției tehnice de aducere a capetelor celor două fragmente la o distanță convenabilă ca ligaza să poată acționa.



Circularizarea segmentelor de DNA cu capete netede, produse de enzimele de restricție, determinată de T4 ligază (după Sgaramella și Ehrlich, 1978)

Enzima de restricție	DNA	Secvențe de rupere	Nr. situ- surilor de rupere	Lungimea medie a seg- mentelor DNA (nucleotide)	Circularizare (%)
Hpa I	pSC101	d(G-T-T-A-	1	9 000	5
	pMB9	-A-C)	1	7 000	5
Sma I	pSC101	d(C-C-C-G-	1	9 000	20
	pMB9	-G-G)	1	6 000	20
Hind II	SPB	d(G-T-Y-R-	10	4 000	25
		-A-C)			
Bsu I	pSC101	d(G-G-C-C)	≈ 10	≈ 900	75
	pMB9		≈ 60	≈ 800	75

Independent unul de celălalt, două colective de cercetători (Jackson și colab., 1972; Lobban și Kaiser, 1973) au pus la punct o metodă simplă și ingenioasă de realizare a acestui deziderat (fig. 27). S-a pornit de la DNA care are porțiuni monocatenare terminale, care se pot lega între ele prin împerecherea bazelor pe baza principiului complementarității lor. Structurile de DNA astfel formate se mențin datorită punților de hidrogen A-T și G-C stabilite, ceea ce facilitează intervenția ligazei. Practic, dacă se pornește de la un DNA CCI, prima etapă a reacției (fig. 27) constă în transformarea lui în DNA liniar. Aceste molecule liniare sînt susceptibile la atacul cu exonuclează din bacteriofagul  $\lambda$ , care le taie capătul 5'-fosfat. Cu ajutorul transferazei terminale (fig. 27, c), la capătul 3'-hidroxil al catenelor de DNA se leagă nucleotide specifice complementare, de exemplu adenină în prezența dATP și timidină în prezența dTTP, ca furnizori de energie și de nucleotide. Prin amestecarea celor două specii de DNA se creează punți de hidrogen între bazele complementare de la capetele lor, ceea ce duce la circularizarea moleculei nou formate. Pentru a umple golurile rămase între catene și a le aduce la faza de „crestătură cu capetele adiacente” se utilizează DNA polimerază, care „cîrpește” lipsurile din catenele simple. În ultima etapă (fig. 27, e) va interveni DNA-ligaza, care în acest fel contribuie la realizarea unui dimer corespunzător DNA de la care s-a pornit.

Vitezele reacțiilor de legare cap-la-cap sînt foarte mici, comparativ cu viteza de legare a crestăturilor monocatenare din duplexul de DNA, iar semnificația lor *in vivo* mai trebuie studiată.

În plus față de activitatea DNA ligazică T4, în extractele de *E. coli* infectată cu bacteriofag T4 s-a pus în evidență și o activitate RNA ligazică independentă, care reușește să transforme fragmente scurte (30—

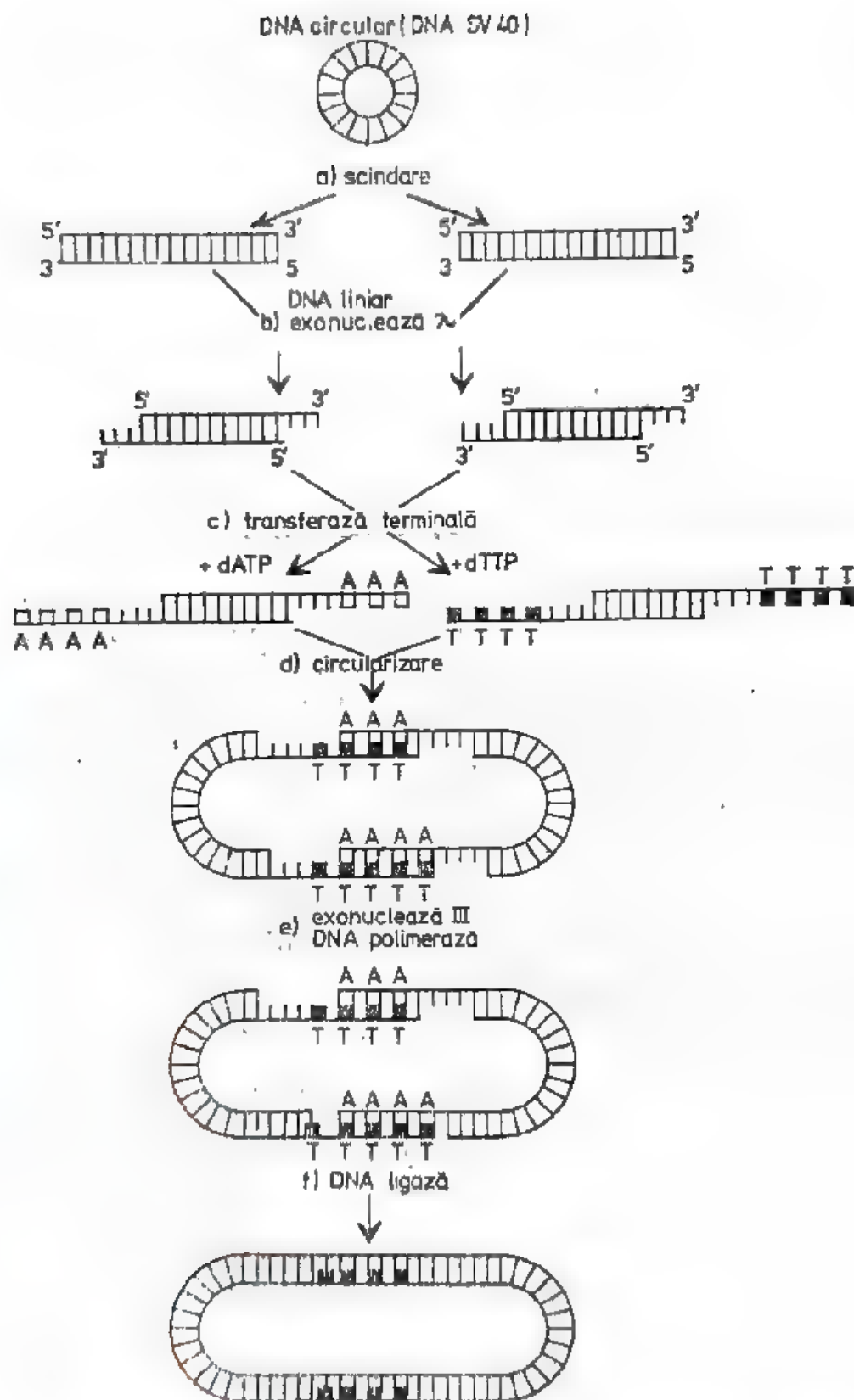


Fig. 27. Formarea unei molecule de DNA dimer cu ajutorul unor enzime printre care și DNA-ligaza (după Jackson și colab., 1972).



40 nucleotide) de poliA sau poliU într-un produs cu conformație circulară, în cadrul unei reacții ATP-dependente. În acest caz, nu este necesară existența unor structuri de tip duplex, care dealtfel s-au dovedit a fi chiar ușor inhibitorii pentru desfășurarea activității RNA ligazei (Silber și colab., 1972).

### IV.3. Proprietățile fizico-chimice ale DNA-ligazelor

#### IV.3.1. Masa moleculară

Analiza electroforetică a DNA-ligazei în gel de poliacrilamidă conținând DDS 0,1%, și în condiții reducătoare, precum și nereducătoare, a permis să se stabilească omogenitatea de compoziție a acestei enzime.

Electroforeza în condiții reducătoare a arătat că masa moleculară relativă a ligazei din *E. coli* este de  $74\,000 \pm 3\,000$  (Modrich și Lehman, 1972) și ceva mai mică,  $65\,000 \pm 3\,000$  (Panet și colab., 1973), pentru DNA-ligază T4. Cercetările au precizat că ambele enzime au molecula formată dintr-un singur lanț polipeptidic, ceea ce a surprins întrucitva, ținând cont de complexitatea reacției pe care o catalizează. Inițial, pentru enzima din *E. coli*, s-au obținut rezultate care pledau pentru o structură cu subunități, dar ulterior s-a precizat că era vorba de artefacte provocate în urma proteolizei enzimei în cursul unor lungi perioade de dializă (Modrich și colab., 1973).

Examinarea enzimei prin ultracentrifugare analitică a arătat de asemenea, existența unei singure benzi, de unde s-a calculat că puritatea preparatelor obținute depășește 95% (Lehman, 1974).

Coeficientul de sedimentare a *E. coli* DNA-ligazei, determinat prin sedimentare analitică la 2,1 mg proteină/ml, s-a stabilit a fi  $S_{20,w} = 3,91$  S, în concordanță cu valoarea de 4,2 S găsită prin ultracentrifugare în gradient de sucroză. Se pare că valoarea 3,91 este mai mică decât cea care era de așteptat pentru o proteină globulară cu masa de 74 000, datorită unei forme moleculare asimetrice a enzimei.

#### IV.3.2. Compoziția în aminoacizi și proprietățile spectrale

Izolarea *E. coli* DNA-ligazei în stare de înaltă puritate și în cantitate suficientă a permis stabilirea compoziției în aminoacizi a enzimei, care este redată în tabelul 8.

Proporția de aminoacizi/mol ligază (după Lehman, 1974)

Aminoacidul	moli/mol ligază	Aminoacidul	moli/mol ligază
Asp	36,2	Gly	51,3
Glu	87,9	Ala	66,5
Lys	32,4	Val	65,7
His	15,3	Leu	70,6
Arg	41,7	Ileu	28,1
Thr	35,5	Phe	26,1
Ser	30,4	Tyr	7,8
1/2 Cys	8,1	Try	7,4
Met	10,0	Pro	33,9

Se știe că absorbția la 280 nm a proteinelor se datorează aminoacizilor cu nucleu aromatic ce intră în compoziția lor. În cazul DNA-ligazei se constată un conținut relativ scăzut de tirozină (sub 2%), ceea ce ar putea explica spectrul în UV, ceva mai neobișnuit, al acestui polipeptid, precum și un raport  $E_{280}/E_{260} = 1,42$ , pentru forma neadenilată a enzimei. La o concentrație de 1 mg proteină/ml s-a determinat  $E_{280} = 0,72$ .

Incubarea *E. coli* DNA-ligazei cu  $\text{NAD}^+$  marcat cu  $^{32}\text{P}$  duce la formarea de adenilatligază, în care un mol de  $^{32}\text{P}$ -AMP revine la 74 000 g enzimă, deci la o moleculă-gram. În urma legării AMP la enzimă se constată că lungimea de undă la care absorbția în UV a proteinei este maximă se schimbă de la 278 nm, pentru enzima liberă, la 268 nm, pentru enzima legată, ca urmare a influenței nucleului purinic ce se atașează la enzimă. Pornind de la presupunerea că nici enzima și nici AMP nu suferă modificări spectrale semnificative în urma formării complexului activat — pe de o parte — și de la scăderea raportului  $E_{280}/E_{260}$  de la 1,42 la 0,99 — pe de altă parte — s-a putut calcula stoechiometria reacției de adenilare, obținându-se proporția de 1 mol AMP: 1 mol proteină enzimatică.

#### IV.3.3. Cofactori și ioni

Se reamintește că *E. coli* DNA-ligaza prezintă specificitate pentru  $\text{NAD}^+$ , ca furnizor de energie în reacția de legare (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967); ea este complet inactivă în prezența ATP. O serie de autori au arătat că  $\text{NAD}^+$  poate fi înlocuit, în calitatea lui de cofactor, numai de către tionicotinamid- $\text{NAD}^+$  sau de un alt analog al  $\text{NAD}^+$ , și anume 3'-izoadenil- $\text{NAD}^+$ . De asemenea, pentru a-și exercita acțiunea această ligază reclamă prezența ionilor de  $\text{Mg}^{2+}$ .



(1—3 mM) (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967) sau  $Mn^{2+}$  (0,2—1,0 mM) (Zimmerman și colab., 1967).

Concentrația optimă de ioni  $Mg^{2+}$  este de 10 mM; la 3 și la 30 mM  $Mg^{2+}$  se constată 35% și, respectiv 80% din activitatea maximă. Ionii de  $Mn^{2+}$  îi pot înlocui pe cei de  $Mg^{2+}$  numai parțial. Concentrația optimă de  $Mn^{2+}$  10 mM restabilește doar 25% din activitatea manifestată în prezența unei concentrații identice de ioni  $Mg^{2+}$ . Exprimarea activității DNA-ligazei *T4* necesită și prezența ditiotreitului, omiterea lui reducând activitatea enzimatică cu 75%. Înlocuirea ditiotreitului cu  $\beta$ -mercaptoetanol duce la o scădere cu 60% a activității acestei enzime (Weiss, 1971). Încă nu este complet elucidat rolul  $Ca^{2+}$  în cursul reacției și există controverse asupra acestui punct (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967).

#### IV.3.4. pH optim și stabilitate

În tampon Tris 66 mM-HCl, pH-ul optim de desfășurare a reacției ligazice este de 7,2—7,8. La pH 6,9 enzima mai prezintă doar 46%, iar la pH 8,0 doar 65% din activitatea la pH 7,6 (Weiss, 1971).

Enzima purificată este activă într-un domeniu de pH relativ larg (6,5—9,5). Activitatea de legare a DNA scade rapid în medii cu tărie ionică scăzută ( $< 40$  mM). Frațiunile de enzimă purificată se inactivează lent chiar în medii cu tărie ionică moderată (0,1 M) și chiar dacă sînt păstrate în glicerol la  $-5^{\circ}C$ , fenomen căruia Zimmerman și Oshinsky (1969) i-au dat următoarea explicație: enzima ar putea exista în trei forme (una complet activă *I*, a doua cu afinitate mai scăzută pentru substratul de DNA *II* și o a treia lipsită de activitate *III*). Inactivarea s-ar datora în principal trecerii formei *I* în *II* și apoi în *III*. Adăugarea de serumalbumină bovină (concentrație finală 0,1%) la soluțiile de DNA-ligază previne inactivarea în medii de tărie ionică moderată. Încălzirea enzimei timp de 5 minute la  $60^{\circ}C$  provoacă inactivarea ei totală.

Spre deosebire de *E. coli* DNA-ligaza, enzima de legare izolată din *E. coli* infectată cu bacteriofagul *T4* s-a dovedit mai stabilă: după o păstrare de cca 6 luni la  $0^{\circ}C$  se înregistrează o pierdere de aproximativ 50% din activitate, dar dacă probelor enzimatică li se adaugă 50% glicerol se pot păstra pînă la șase luni, la  $-15^{\circ}C$ , fără o pierdere semnificativă a activității ( $< 10\%$ ) (Weiss, 1971).

#### IV.3.5. Temperatura optimă

Viteza reacției enzimatică este mult influențată de temperatură: la  $0^{\circ}C$ ,  $10^{\circ}C$  și  $20^{\circ}C$  se observă doar 10, 20 și, respectiv 55% din viteza la  $37^{\circ}C$ ; la  $45^{\circ}C$  se regăsește doar 20% din activitatea la  $37^{\circ}C$  și se observă inactivarea ireversibilă a enzimei.

#### IV.4. Izolarea și purificarea DNA-ligazelor

Pentru izolarea și purificarea ligazelor au fost puse la punct mai multe metode, în general greoaie și laborioase, comportând un număr variabil de etape, dintre care nu lipsesc însă precipitarea cu sulfat de amoniu, pentru îndepărtarea excesului de proteine celulare, și cromatografia pe coloană de DEAE-celuloză în gradient de săruri, care are drept scop separarea ligazelor de enzimele cu acțiune exonucleazică, ce eluează la alte concentrații saline, mai mici.

În cazul *E. coli* DNA-ligazei, Olivera (1971) dă următoarea schemă de izolare și purificare (tabelul 9):

Tabelul 9

Purificarea *E. coli* DNA-ligazei (după Olivera, 1971)

Frațiunea	Volumul		Activitatea specifică (unit./mg proteină)
	total (ml)	totală (unit.)	
I. Extract celular bacterian	172	8 680	2,4
II. Precipitare cu streptomycină	735	(3 620)*	(2,6)*
III. Precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	52	5 040	8,1
IV. Cromatografie pe DEAE-celuloză	38	2 800	75
V. Cromatografie pe fosfo-celuloză	35	1 022	1575 (12% din activitatea inițială)

\* Streptomicina reziduală inhibă reacția de testare a activității ligazice, dând rezultate false în această etapă.

Metoda propusă a permis o purificare de 650 ori a enzimei.

Spargerea celulelor pentru obținerea extractului se realizează prin ultrasonicare. Resturile celulare se îndepărtează prin centrifugare, iar la supernatant se adaugă streptomycină, pentru îndepărtarea acizilor nucleici înalt polimerizați. Se centrifughează, iar noul supernatant care rezultă se tratează imediat cu sulfat de amoniu; se obține astfel fracțiunea III, care în continuare, se supune cromatografiei pe coloană de DEAE-celuloză. Eluția se face în gradient de săruri. Frațiunea enzimatică activă suferă o nouă cromatografie, pe fosfo-celuloză. Noile fracțiuni în care eluează enzima se unifică și se concentrează prin dializă contra sucroză solidă. În acest mod se recuperează cca 75% din activitatea enzimei cuprinsă în fracțiunea V.

În extractele celulare enzima poate exista sub formă liberă sau legată ca adenilatligază. Cromatografia pe fosfo-celuloză este ineficace dacă enzima este legată, deoarece această formă nu se adsoarbe bine



pe fosfoceluloză; de aceea se recomandă ca tamponalele de lucru să conțină EDTA, care determină ca enzima să existe în special sub formă liberă.

Un procedeu analog de purificare, cu mici diferențe, au folosit Weiss și colab. (1968) și Weiss (1971) în cazul DNA-ligazei T4 (tabelul 10):

Tabelul 10

## Purificarea DNA ligazei T4 (după Weiss și colab., 1968)

Etapa	Activitate		Proteină (mg/ml)	Rendament (%)
	totală (unit. $\times 10^{-3}$ )	specifică (unit./mg prot.)		
I. Extract celular bacterian	153	11,6	11,4	100
II. Precipitare cu streptomycină	98	2,0	5,0	64
III. Precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	48	2,8	15,2	31
IV. Cromatografie pe DEAE-celuloză I	38	3,6	3,5	25
V. Cromatografie pe DEAE-celuloză II	16 (24)	14 (21)	0,15	10
VI. Cromatografie pe fosfoceluloză	9 (14)	—	0,01	6
VII. Concentrare	8 (12)	1700(2500)	0,08	5

Fracțiunea VII — eluatul de pe fosfoceluloză, concentrat — a fost purificată de cca 1000 ori față de produsul inițial.

Recent, Moore și James (1976) au simplificat metoda propusă în 1968 de Weiss și colab. (1968), ceea ce a ușurat și urmărirea activității enzimatică pe parcursul procesului de purificare. Ei au folosit schema din tabelul 11:

Tabelul 11

## Purificarea DNA-ligazei T4 (după Moore și James, 1976)

Fracțiune	Volum (ml)	Proteină (mg/ml)	Proteină totală (mg)	Activitate (unit. $\times 10^{-6}$ )
I. Extract celular total	400	26,5	10600	—
(Precipitare cu streptomycină)				
II. Precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	4,6	460	—
III. Eluat de pe fosfoceluloză	255	0,15	38	3,6
IV. Eluat de pe DEAE-celuloză	250	0,045	11,3	1,9
V. Concentrat cu glicerol	68	0,16	10,9	1,7

De reținut inversarea ordinei în care se face cromatografia pe fosfoceluloză: în procedeul propus de Weiss și colab. (1968) aceasta urma separării pe DEAE-celuloză; de asemenea, s-a renunțat la una dintre cele două separări pe DEAE-celuloză (compară cu tabelul 10).

Folosind tehnologia DNA recombinant, Panasenکو și colab. (1977) au construit un hibrid de *E. coli* și bacteriofag  $\lambda$ , hibrid care conține gena *E. coli* DNA-ligazei. În acest caz, bacteriofagul  $\lambda$  a fost folosit ca vehicul pentru amplificarea genei; s-a reușit o creștere de cca 500 ori a activității ligazei în acest lizogen stabil. În extractele celulare bacteriene infectate cu acest recombinant, ligaza ajunge să reprezinte cca 5% din proteinele celulare, ceea ce ușurează considerabil procesul de purificare a enzimei, pentru care Panasenکو și colab. (1978) propun următoarea schemă (tabelul 12):

Tabelul 12

Purificarea DNA-ligazei din recombinantul *E. coli* 594 *gt4 lop 11 lig<sup>+</sup>S7* (Panasenکو și colab., 1978)

Etapa	Proteină (mg/ml)	Activitate		Randa- ment %
		totală (unit. $\times 10^{-3}$ )	specifică (unit./mg prot.)	
I. Extract celular	21	4,7	75	(100)
II. Precipitare cu Polymix P	—	3,4	—	112
III. Precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	11,8	4,4	375	94
IV. Cromatografie pe fosfoce- luloză	0,015	2,0	6000	43
Concentrarea fracțiunii IV	7,0	2,1	6300	44

Metoda permite obținerea unei enzime cu o puritate mai mare de 95%, sub forma unui pic foarte strâns la cromatografia pe fosfoceluloză (fig. 28).

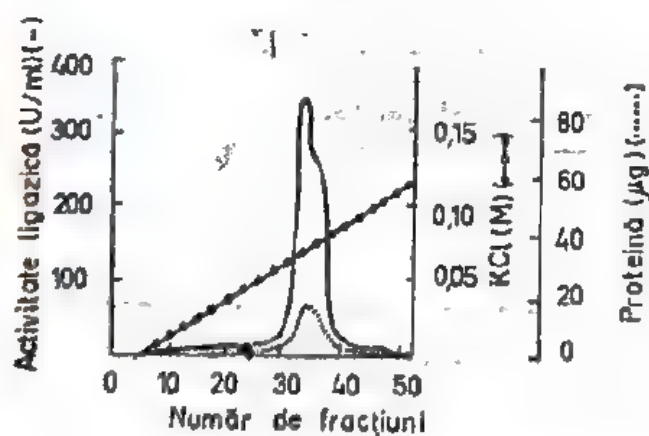


Fig. 28. Cromatografia pe fosfoceluloză a fracțiunii a III-a, cu obținere de DNA-ligază pură (după Panasenکو și colab., 1978).

#### IV.5. Testarea activității DNA-ligazice

Activitatea DNA-ligazelor se exprimă în unități. Pentru unitatea de DNA-ligază T4, Weiss și colab. (1968) dau următoarea definiție: unitatea este acea cantitate de ligază care catalizează în 20 minute



conversia unui picomol \* de  $^{32}\text{P}$ -fosfomonoesteri într-o formă rezistentă la acțiunea fosfatazei alcaline, iar Kleppe și colab. (1970) aduc unele mici modificări de enunț: unitatea este acea cantitate de enzimă care catalizează transformarea într-un minut a unui pM de capete  $^{32}\text{P}$ -5'-fosfat din dT<sub>10</sub> la o formă nesusceptibilă la acțiunea fosfatazei alcaline bacteriene, în condiții standard (Gupta și colab., 1968).

Pentru testarea activității ligazice s-au descris patru clase majore de reacții și anume:

A. formarea adenilatligazei, intermediar acidoinsolubil, prin reacția dintre enzima liberă și  $\text{NAD}^+$  marcat la restul de adenină (Zimmerman și Oshinsky, 1969);

B. conversia unui DNA liniar la o formă circulară și detectarea lui fie prin: a) proprietăți de sedimentare alterate (Gefter și colab., 1967; Gellert, 1967), fie prin b) absența susceptibilității la acțiunea exonucleazelor (Modrich și Lehman, 1970; Olivera și colab., 1968) sau prin alte metode;

C. conversia unui DNA denaturat la o formă renaturabilă și detectarea DNA nativ prin adsorbția sa selectivă pe hidroxiapatită (Zimmerman și colab., 1967);

D. conversia capetelor 5'-fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați, nesusceptibili la acțiunea fosfatazei alcaline de origine bacteriană (Olivera și Lehman, 1967a; Weiss și Richardson, 1967).

Toate aceste metode sînt general valabile pentru testarea oricărei activități ligazice, cu excepția primei grupe de reacții (A), care nu se poate aplica decît acelor DNA-ligaze care — pentru a-și desfășura acțiunea — au nevoie de prezența  $\text{NAD}^+$  drept cofactor.

Metoda A. folosește cel mai simplu substrat; totuși nu se poate folosi decît după ce probele au fost dializate, pentru îndepărtarea  $\text{NAD}^+$  endogen. Metodele B. și C. folosesc drept substrat DNA de bacteriofag  $\lambda$  (sau oricare DNA bacteriofagic cu o structură similară). Dacă se urmărește testarea unui număr mare de probe — cazul procesului de izolare și purificare a enzimei — metodele acestea se dovedesc greoaie. În plus, metoda B. a) este deosebit de sensibilă la prezența endonucleazelor care ar putea impurifica preparatele de ligază. Metodele B. a) și D. sînt convenabile pentru a fi folosite cînd este nevoie să se facă screening-ul unui număr mare de probe. Există și aici un inconvenient și anume exonucleaza cu care se lucrează (metoda B. b)) trebuie să fie lipsită de activitate endonucleazică. Pentru a da rezultate bune, metoda D. necesită un  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP cu o activitate specifică ridicată, precum și o polinucleotidkinază cu un înalt grad de puritate.

În continuare se vor analiza pe rînd cîteva din grupele de metode de interes general, cu aplicabilitate pentru toate tipurile de ligază, deci grupele B., C., D.

\* 1 picomol (pM) =  $10^{-12}$  moli

### IV.5.1. Conversia DNA liniar la forma CCI

Accastă conversie se poate pune în evidență prin diverse mijloace.

**IV.5.1.1. Ultracentrifugare.** Ca urmare a acțiunii ligazice asupra formelor liniare de DNA (de natură bacteriofagică, de exemplu  $\lambda$  sau T7) apar forme CCI DNA, cu proprietăți de sedimentare în gradient de densitate deosebite și anume: formele CCI prezintă o densitate mai mare decât cele liniare. DNA bacteriofagici amintiți mai sus au la capetele structurii lor bicatenare regiuni monocatenare complementare; acestea pot interacționa fie intracatenar, cu formare de molecule circulare, legate prin punți de hidrogen, fie intercatenar și atunci apar dimeri sau alți oligomeri, formați tot prin punți de hidrogen. Atît monomerii, cît și oligomerii circulari prezintă în molecula lor dublu catenară unele creștături (*nicks*) monocatenare, care constituie locul de acțiune al DNA-ligazelor.

Moleculele CCI se detectează după formare prin rapida lor sedimentare (de 3,6—4 ori) în gradient de sucroză în mediu alcalin, față de moleculele liniare.

Lucrînd cu DNA din bacteriofagul T7 ca substrat pentru testarea activității DNA-ligazei T4, Weiss și Richardson (1967) au obținut următoarele rezultate (fig. 29):

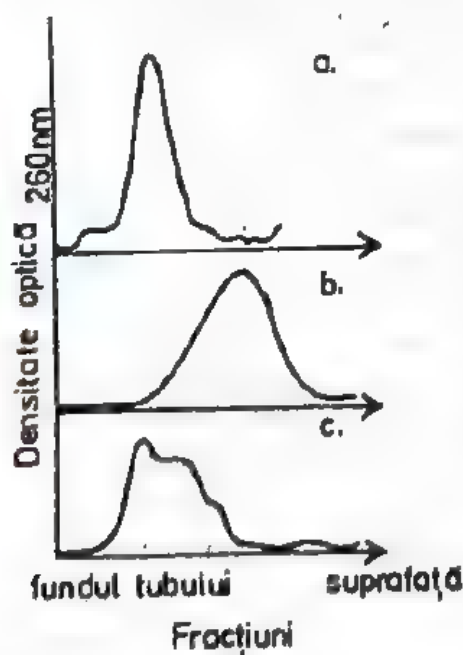


Fig. 29. Ultracentrifugarea analitică în gradient de sucroză și în mediu alcalin a produșilor reacției ligazice: a) DNA T7 martor; b) DNA T7 cu creștături realizate prin tratament cu DNază pancreatică, incubat cu ligază în absența ATP; c) DNA T7 cu creștături (vezi mai sus) incubat cu ligază în prezența ATP. Preparatele de DNA s-au denaturat anterior ultracentrifugării (după Weiss și Richardson, 1976).

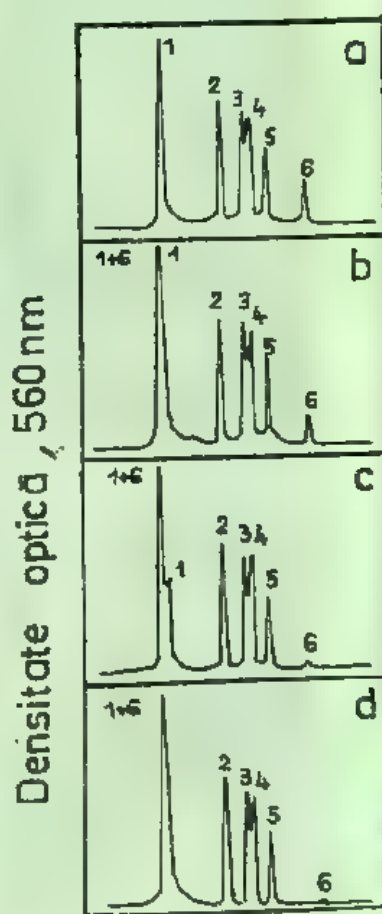
Se observă că DNA T7 intact (fig. 29, a) are o densitate mai mare decât cel cu creștături într-una din catene (fig. 29, b), mergînd spre partea de jos a tubului. Prin acțiunea DNA-ligazei T4 o parte din materialul lezat se repară, el comportîndu-se la ultracentrifugare asemănător cu martorul (fig. 29, c).



**IV.5.1.2. Electroforeză.** Metoda folosește ca substrat pentru acțiunea ligazei DNA de bacteriofag  $\lambda$ , care a fost anterior supus hidrolizei cu endonucleaza de restricție *Eco RI*, rezultând șase fragmente cu următoarele mase moleculare:  $12 \times 10^6$  D (1),  $4 \times 10^6$  D (2),  $3,3 \times 10^6$  D (două fragmente identice) (3, 4),  $2,7 \times 10^6$  D (5),  $2,1 \times 10^6$  D (6). În momentul în care ligaza testată este pusă în contact cu aceste fragmente de DNA se constată dispariția de pe electroforegramă a benzii cu masa de  $2,1 \times 10^6$  D; are loc conversia benzilor 1 și 6, care se leagă inițial prin punți de hidrogen, la o formă *CCI*, nedegradabilă termic (fig. 30). Punerca în evidență a fragmentelor de DNA se face în UV, prin colorare cu bromură de etidiu.

**IV.5.1.3. Microscopie electronică.** Colorații specifice pot pune în evidență acizii nucleici. Pe preparate se pot deosebi formele *CCI* de cele

Fig. 30. Densitograma produșilor reacției ligazice, separați electroforetic. S-a înregistrat intensitatea fluorescenței benzilor de DNA colorat cu bromură de etidiu. Cantitatea de enzimă folosită a variat, crescând de la a) (o unitate) la d) (2 unități) (după Moore și James, 1976).



Migrare electroforetică

liniare. Moleculele rezultate prin circularizare intracatenară cu punți de hidrogen se aduc anterior colorării la conformația de DNA liniar. Metoda a fost pusă la punct de Sgaramella în 1972.

**IV.5.1.4. Ultrafiltrare.** Filtrele nitrocelulozice reușesc să facă discriminarea între diverse conformații ale DNA: liniar, circular cu punți de hidrogen — pe de o parte — și circular deschis (CD) și circular covalent

închis (*CCI*) — pe de altă parte. Primele forme enumerate trec prin filtre, în timp ce celelalte două sînt reținute. Drept substrat se utilizează, și în acest caz,  $^3\text{H}$ - sau  $^{32}\text{P}$ -DNA  $\lambda$  sau analog, după cum au preconizat Reiser și colab. (1976). Substratul, adus la forma sa liniară, se incubează cu probele de ligază, iar apoi reacția se stopează cu un detergent, de exemplu DDS. „Cercurile Hershey” (formate prin punți de hidrogen) sînt aduse la forma liniară. Se face apoi filtrarea. Formele *CD* și *CCI* rămîn pe filtru și se poate măsura radioactivitatea reținută, din care se apreciază gradul de legare.

IV.5.1.5. Enzimatic, cu exonuclează. Moleculele de tip *CCI*, formate prin legarea capetelor 3'-hidroxil și 5'-fosfat cu apariția legăturilor fosfodiesterice, devin insensibile la acțiunea exonucleazei III, după cum au constatat Olivera și Lehman (1967 a). Ca substrat, în acest caz, se pot folosi și polideoxiribonucleotide sintetice, de tipul copolimerului  $(\text{dA})_n \cdot (\text{dT})_n$  (cu cca 1000 nucleotide) propus de Modrich și Lehman (1970). Metoda prezintă o mare sensibilitate, aproximativ 1000 nucleotide devenind nesusceptibile la exonucleaza III ca urmare a sintezei unei singure legături fosfodiesterice.

Dintre aceste metode, metoda electroforezei și cea electronoptică permit aprecierea reacției ligazice mai ales din punct de vedere calitativ, pe cînd metoda ultracentrifugării, a ultrafiltrării și cea enzimatică permit și aprecieri cantitative asupra reacției ligazice, pe baza produselor marcate utilizate drept substrat.

#### IV.5.2. Conversia DNA denaturat la forme renaturabile

Acest proces se pune în evidență prin adsorbție selectivă pe hidroxiapatită (Zimmerman și colab., 1967). În esență el constă în formarea de dimeri între un DNA liniar marcat și un DNA de bacteriofag  $\lambda$  care conține legături încrucișate (*cross links*) intercatenare, induse special în acest scop, cu ajutorul unor agenți alchilanți. După legarea lor cu ajutorul DNA-ligazei, DNA se denaturează cu alcalii, care desfac toate legăturile în afara celor covalente. Apoi *pH*-ul se corectează la neutru, iar DNA se adsoarbe pe hidroxiapatită, în condiții în care se adsorb numai formele native, nu și cele denaturate. Spre deosebire de DNA normal, nativ, cel care conține în molecula sa legături încrucișate se renaturează imediat după readucerea probei la *pH* neutru. Împreună cu el rămîne și catena de DNA liniar atașată sub acțiunea DNA-ligazei, iar cealaltă catenă nu se adsoarbe. Măsurarea activității reținute pe coloana de hidroxiapatită permite evaluarea reacției ligazice, iar DNA cu legături încrucișate constituie un purtător pentru oricare



DNA marcat ce i s-a alipit ca urmare a acțiunii ligazice. Schematic, procesul de legare a unui DNA de DNA cu lăcșuri încrucișate se poate rezuma ca în fig. 31 (Gellert, 1971).



Fig. 31. Formarea dimerilor (a și b) din molecule mai mari prin legături de hidrogen între  $^3\text{H}$ -DNA de bacteriofag  $\lambda$  și DNA  $\lambda$  cu lăcșuri încrucișate intramoleculare (după Gellert, 1971).

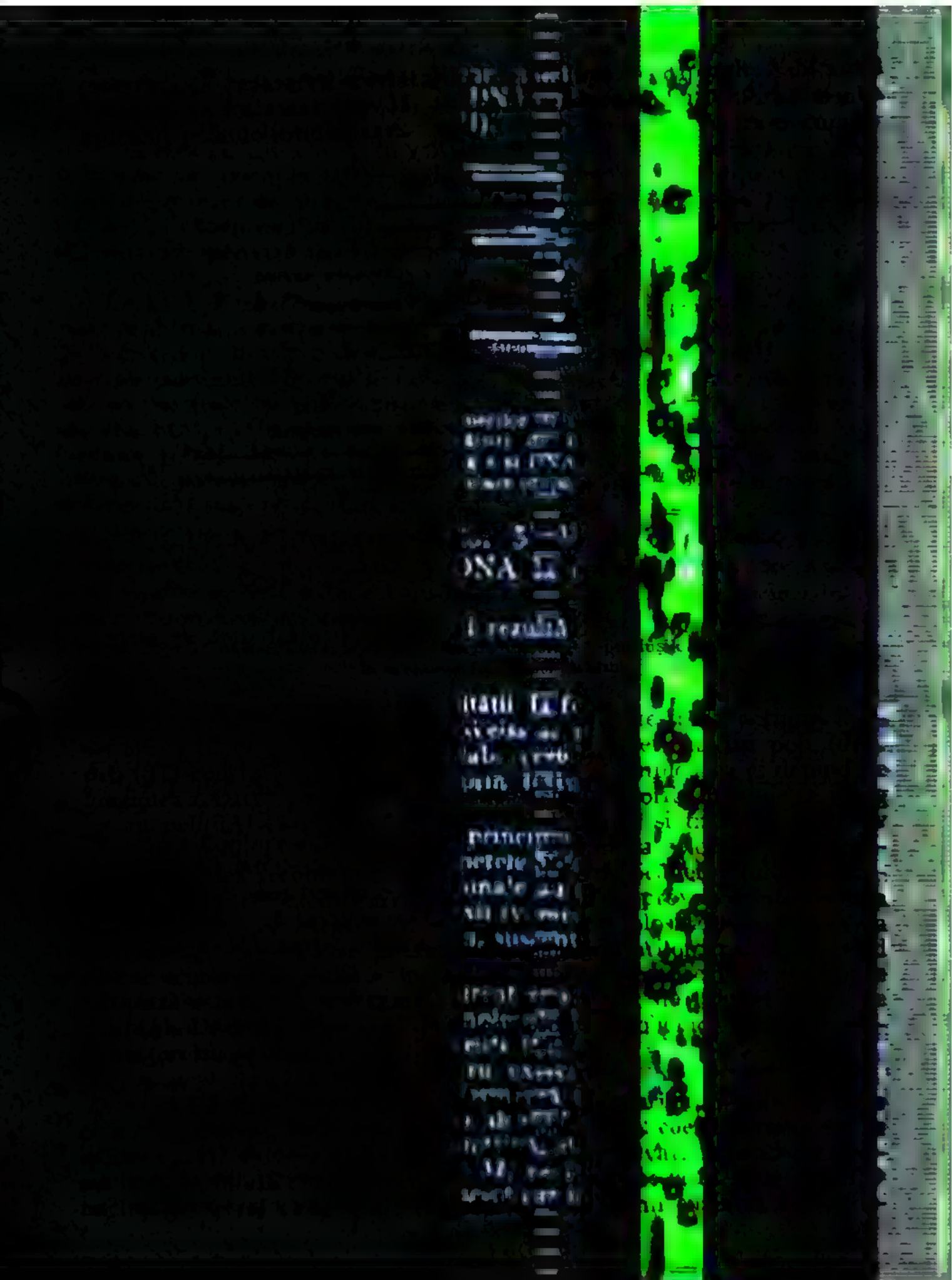
#### IV.5.3. Conversia capetelor $5'$ - $^{32}\text{P}$ -fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați

Ca urmare a acestei conversii rezultă o serie întreagă de efecte, printre care:

**IV.5.3.1. Pierderea susceptibilității la fosfataza alcalină de origine bacteriană.** O serie de autori ca Weiss și Richardson (1967), Olivera și Lehman (1967 a), Gefter și colab. (1967) au arătat că activitatea ligazică poate fi determinată și prin testul susceptibilității DNA la fosfataza alcalină.

Testul are la bază următorul principiu: fosfataza alcalină hidrolizează grupările fosfat situate la capetele  $5'$  fosfat ale DNA. Or, în situația în care grupările  $5'$ -fosfat terminale au depășit grani interacțiunea lor cu grupările terminale  $3'$ -hidroxil (v. mecanismul de acțiune al ligazei), tocmai datorită acțiunii ligazei, susceptibilitatea DNA la fosfataza alcalină dispare (fig. 32).

În prima etapă, substratul marcat se scindează (fig. 32, a) cu ajutorul DN-azei I, obținându-se în moleculă lăcșuri creștături având capete  $3'$ -hidroxil și  $5'$ -fosfat adiacente (fig. 32, b). La rândul lor, aceste molecule constituie substrat pentru exercitarea acțiunii ligazice. În prezența enzimei de legare se reformează molecula inițială, reparată (fig. 32, c), asupra căreia fosfataza alcalină nu poate acționa, întrucât nu are capete fosfat libere. Dimpotrivă, dacă fosfataza este pusă în contact cu componenta b) din fig. 32, ea își va exercita acțiunea de scindare a grupărilor fosforice. În acest caz însă, ligaza nu va mai putea





refragarea în gradient de zahără în mediu alecun a arătat că 65% din lanțurile de poli(dT) ating un coeficient de sedimentare de cel puțin două ori mai mare decât poli(dT) reacionate, iar 5% din produsul de reacție sedimentează chiar de 20 de ori mai rapid decât substratul inițial (Weiss și Richardson, 1967).

IV.5.3.3. Scăderea numărului de capete 5'-fosfat ale substratului, apreciat prin calcularea diferenței între numărul lor la începutul reacției ligazice și numărul lor la terminarea reacției. Metoda a fost propusă de către Weiss și Richardson (1967) și a fost reluată de Sladkova (1976), care utilizează ca substrat tot DNA de bacteriofag T7, dar care calculează de fapt numărul leziunilor reparate, cu capete 5'-fosfat incluse în legături fosfodiesterice și nu capetele 5'-fosfat rămase libere.

IV.5.3.4. Alte metode. În afara metodelor de testare a activității DNA ligazice (de reparare a leziunilor cu capete 3'-hidroxil și 5'-fosfat adiacente dintr-o singură catenă a DNA bicatenar) prezentate, în literatura de specialitate se mai întâlnesc numeroase altele, cum ar fi:

- legarea unei catene polinucleotidice la o altă catenă polinucleotidică imobilizată pe o matrice solidă, de exemplu prin esterificarea capătului ei 5'-fosfat cu o grupare hidroxil a unui rest de glucoză din celuloză (Spadari și colab., 1971);

- folosirea ca substrat a acidului polideoxicitidilic marcat cu  $^{125}\text{I}$ ; sensibilitatea crescută a metodei (de 1000 de ori mai mare) permite scăderea limitei de determinare a activității ligazice sub cea a metodelor curente (Spadari, 1972);

- reducerea numărului situsurilor accesibile unei DNA polimeraze (Karkas, 1974);

- restabilirea activității de transformare a DNA lezat (Ando și Hosawa, 1970; Laipis, 1969) etc.

Majoritatea metodelor sînt, în general, deosebit de laborioase și implică și folosirea altor enzime, cu un înalt grad de puritate, precum și a unor substraturi greu de preparat și care trebuie să aibă o activitate specifică a izotopului cu care sînt marcate suficient de ridicată. De aceea, dacă este nevoie doar de a se obține o dovadă calitativă a activității ligazice, cea mai accesibilă este metoda electroforetică: reacția de legare are loc în condiții standard pentru enzimă, iar produsul rezultat este analizat pe gel de agaroză și pus în evidență în UV, după colorare cu bromură de etidiu.

#### IV.5.4. Rolul *in vivo* al DNA-ligazelor

Majoritatea cunoștințelor asupra funcției *in vivo* a DNA-ligazelor se datorează studiului unor mutante bacteriene în care enzima este defectivă. Întrucît etapa de legare a unor fragmente de DNA este pre-

zentă în toate modelele de recombinare genetică, în repararea leziunilor moleculare la nivelul DNA, precum și în replicarea DNA, se poate presupune că lipsa ligazei din anumite bacterii va produce o serie de aberații în oricare din aceste procese, ceea ce va influența și indirecta teh-

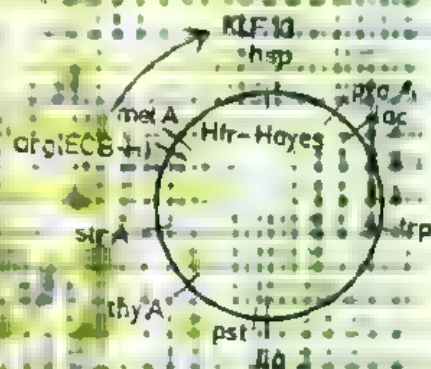


Fig. 33 Localizarea genelor structurale pentru DNA-ligază pe harta genetică a *E. coli* (după Taylor și Trotter, 1967)

ni enzimelor. S-au descris numeroși mutanți defectivi, atât în ceea ce privește *E. coli* DNA-ligaza, cât și DNA-ligaza T4.

Se cunosc două mutații ale genei structurale pentru ligază, iar ambele sînt situate pe harta genetică a *E. coli* la aproximativ 45 minute (Gottesman și colab., 1973; Taylor și Trotter, 1967) (fig. 33).

Deși extractele celulare ale ambilor mutanți conțin enzime anormale, termosensibile, numai unul dintre mutanți și anume *E. coli* *ligts7* (Gottesman și colab., 1973) este un mutant condițional letal, care nu supraviețuiește la 42°C, în timp ce mutantul celălalt *lig4* se comportă diferit. Ambii mutanți cultivă normal la 30°C. Diferența între comportările lor s-ar putea datora unei proporții diferite de activitate ligazică reziduală, care să persiste la temperatură ridicată.

Este interesant de văzut care sînt consecințele fiziologice ale acestor mutații. Mutantul *ligts7*, după cum s-a arătat mai sus, nu poate cultiva la 42°C și își pierde viabilitatea atunci cînd este trecut de la temperatura permisivă de 25°C la o temperatură nepermisivă (42°C). Același mutant s-a dovedit a fi deosebit de sensibil la agenții de alchilare, cum ar fi metilmetansulfonatul, sau la acțiunea razelor UV, chiar la temperatura permisivă. Bacteria care a suferit această mutație devine incapabilă să se repare leziunile provocate la nivelul DNA de către agenții alchilanți mutageni.

Tulpina *ligts7*, după cum se poate presupune, prezintă defecte și la nivelul replicării DNA; lipsa ligazei duce la acumulări mari de fragmente Okazaki (Okazaki și colab., 1968), cu mult peste cele găsite la tulpina salvatică. Întreaga cantitate de <sup>3</sup>H-timidină care se încorporează de către *E. coli* *ligts7* în cursul unei marcări de scurtă durată (10 secunde) la 42°C se regăsește într-o fracțiune de DNA cu coeficientul de sedimentare 10S. În condiții de creștere similare, tulpina *E. coli* *lig+* încorporează <sup>3</sup>H-timidina într-un DNA cu coeficient de sedimentare de 24S sau chiar puțin mai mare. Dacă marcarea de scurtă durată (în puls) a *E. coli* *ligts7* la 42°C este urmată de un tratament de 5 mi-



nute, la 25°C cu un exces de timidină nemarcată, cea mai mare parte a timidinei tritiate încorporate apare într-un DNA cu un coeficient mediu de sedimentare de 30S, ceea ce sugerează că materialul de 10S care se acumulează în mutant la temperatura nepermisivă este un precursor al DNA înalt polimerizat.

Întrucît existența unei DNA-ligaze funcționale este esențială pentru replicarea normală a DNA, precum și pentru repararea unor leziuni care pot apare la nivelul DNA, se pune întrebarea cum se poate explica creșterea normală, cît și viabilitatea mutantului *lig4* la temperaturi la care în extractele brute se găsește doar 1%, sau sub această valoare, activitate ligazică? S-ar putea ca ligaza să fie prezentă în celulă într-o cantitate mult mai mare decît cea de care celula are nevoie în mod normal.

Pe baza masei moleculare de 14000 a enzimei *E. coli* DNA-ligază s-a făcut estimarea numărului de molecule de DNA ligază per celulă bacteriană, comparîndu-se activitatea enzimei pure cu activitatea determinată în extractele bacteriene brute. S-a constatat astfel că celulele de *E. coli* tulpină sălbatică crescute pe medii îmbogățite, ajung să conțină 200—400 replici de enzimă per celulă, număr apropiat de cel calculat pentru DNA-polimeraza I (Richardson și colab., 1964). Întrucît, la fel ca și DNA-polimeraza, DNA-ligaza acționează în ultima etapă a multiplicării DNA (Okazaki și colab., 1972), s-ar putea ca această asemănare frapantă între concentrațiile celor două enzime să nu fie întimplătoare, ci să aibă o anumită semnificație legată de replicarea DNA.

Așa după cum s-a arătat anterior, o celulă de *E. coli* conține aproximativ 300 molecule de DNA-ligază (Modrich și colab., 1973). Întrucît turnover-ul enzimei este de 25 min<sup>-1</sup> la 30°C (Modrich și Lehman, 1973), rezultă că în fiecare minut, într-o celulă pot fi reparate pînă la 7500 de creștături monocatenare ale moleculei de DNA. Deoarece ambele catene ale DNA cromozomal se replică în mod discontinuu (Gottesman și colab., 1973), iar DNA cromozomal de *E. coli* — la 30°C — se replică în aproximativ 65 minute (Bird și Lark, 1970), ținînd cont că lungimea medie a unui fragment Okazaki este de aproximativ 1000 nucleotide (Okazaki și colab., 1972), ar fi de ajuns ca într-o celulă, per minut, să aibă loc 200 de legări pentru ca multiplicarea celulelor să se poată produce.

### Bibliografie

1. Ando, T., Kosawa, T., *Biochim. Biophys. Acta* 204, 257 (1970).
2. Bird, R.E., Lark, K.G., *J. Mol. Biol.* 49, 343 (1970).
3. Bode, V.C., Kaiser, A.D., *J. Mol. Biol.* 10, 148 (1965).
4. Cozzarelli, N.R., Melchea, N.E., Jovin, T.M., Kornberg, A., *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 28, 578 (1967).
5. Fareed, G.C., Wilt, E.M., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.* 246, 925 (1971).
6. Geffer, M.L., Becker, A., Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 58, 240 (1967).

7. Gellert, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **57**, 148 (1967).
8. Gellert, M., in „*Methods in enzymology*“, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 326 (1971).
9. Gottesman, M.M., Hicks, M., Gellert, M., *J. Mol. Biol.* **77**, 531 (1973).
10. Gumpert, R.L., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **68**, 2559 (1971).
11. Gupta, N.N., Ohtsuka, E., Weber, U., Chang, S.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **60**, 285 (1968).
12. Hall, Z.W., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.* **244**, 43 (1969).
13. Harvey, C.L., Gabriel, T.F., Wilt, E.M., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.* **246**, 4523 (1971).
14. Howell, S.H., Stern, H., *J. Mol. Biol.* **55**, 357 (1971).
15. Jackson, D.A., Symonds, R., Berg, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **69**, 2904 (1972).
16. Karkas, J.D., *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 452 (1974).
17. Kellenberg, G.M., Zichichi, M.L., Weigle, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **47**, 869 (1961).
18. Kleppe, K., van de Sande, J.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **67**, 68 (1970).
19. Laipis, P.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **62**, 269 (1969).
20. Lehman, I.R., *Science* **186**, 790 (1974).
21. Lehman, I.R., in „*The enzymes*“, ed. P. Boyer, Acad. Press (New York), vol. X, p. 237 (1974).
22. Lindhal, T., in „*Methods in enzymology*“, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 333 (1971).
23. Lindhal, T., Edelman, G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **61**, 680 (1968).
24. Lobban, P., Kaiser, A.D., *J. Mol. Biol.*, **78**, 453 (1973).
25. London, J., Knight, M., *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 241 (1966).
26. Meselson, M., Weigle, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **47**, 857 (1961).
27. Mizutani, S., Temin, H., Nasahiko K., Robert W., *Nature New Biol.*, **230**, 232 (1971).
28. Modrich, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **245**, 3626 (1970).
29. Modrich, P., Lehman, I.R., *Fed. Proc.*, **31**, 441 (1972).
30. Modrich, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7502 (1973).
31. Modrich, P., Anraku, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7495 (1973).
32. Modrich, P., Lehman, I.R., Wang, J.C., *J. Biol. Chem.*, **247**, 6370 (1972).
33. Moore, S.K., James, E., *Analyt. Biochem.*, **75**, 545 (1976).
34. Olivera, B.M., in „*Methods in enzymology*“, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 311 (1971).
35. Olivera, B.M., Hall, Z.W., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **61**, 237 (1968).
36. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1462 (1967a).
37. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1700 (1967b).
38. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 261 (1968).
39. Olivera, B.M., Scheffer, D., Lehman, I.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 275 (1968).
40. Okazaki, R., Arisawa, M., Sugino, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 2954 (1972).
41. Okazaki, R., Okazaki, T., Salub, K., Sugimoto, K., Sugino, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **59**, 598 (1968).
42. Parascenko, S.M., Anazard, R.D., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **253**, 4590 (1978).
43. Parascenko, S.M., Cameron, J.R., Davies, R.W., Lehman, I.R., *Science*, **196**, 188 (1977).
44. Panet, A., van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana, G.H., Raaij A.J., Lillehaug J.R., Kleppe, K., *Biochemistry* **12**, 5045 (1973).
45. Reiser, J., Bentley, C.M., Yan, R., *Analyt. Biochem.*, **75**, 555 (1976).
46. Richardson, C.C., Schildkraut, C.L., Aposhian H.V., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, **239**, 222 (1964).
47. Sgarbetta, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3389 (1972).



48. Sgaramea, V., Bursztyn-Pettengrow, H., Ehrlich, D.S., in „*Recombinant molecules: impact on science and society*“, 10-th Miles Internat. Symp., ed. R.F. Beers & E.G. Bassot, Raven Press (New York), p. 57 (1977).
49. Sgaramea, V., Ehrlich, S.D., *Eur. J. Biochem.*, **86**, 531 (1978).
50. Sgaramea, V., van de Sande, J.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **67**, 1468 (1970).
51. Silber, R., Malathi, V.G., Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3009 (1972).
52. Sladkova, N.I., *Bioorg. Himia*, **2**, 822 (1976).
53. Spadari, S., *Analyt. Biochem.*, **63**, 380 (1972).
54. Spadari, S., Ciarrochi, G., Falaschi, A., *Eur. J. Biochem.*, **22**, 1. (1971).
55. Taylor, A.L., Trotter, C.D., *Bacteriol. Rev.*, **31**, 332 (1967).
56. Tsukada, K., Ichimura, M., *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **42**, 1156 (1971).
57. Young, E.T., Sinsheimer, R.L., *J. Mol. Biol.*, **10**, 562 (1964).
58. Wang, J.C., *J. Mol. Biol.*, **55**, 523 (1971).
59. Weiss, B., in „*Methods in enzymology*“, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 319 (1971).
60. Weiss B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4543 (1968).
61. Weiss, B., Richardson, C.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1021 (1967).
62. Weiss, B., Thompson, A., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4556 (1968).
63. Zimmerman, S.B., Little, J.W., Oshinsky C.K., Gellert, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1841 (1967).
64. Zimmerman, S.B., Oshinsky, C.K., *J. Biol. Chem.*, **244**, 4689 (1969).

## V. Vehicule (vectori)

Așa cum s-a arătat un *vehicul* sau un *vector* este o moleculă de DNA care are proprietatea de a se replica independent de cromozomul celular, proprietate pe care și-o păstrează și atunci când în moleculă sa se introduce în mod artificial un fragment de DNA străin (v. cap. „Pasagerii”), purtător al unei informații genetice noi. Este de notat că inserția fragmentului de DNA în vehicul trebuie astfel realizată încât funcțiile esențiale ale vehiculului, necesare replicării lui, să nu fie deranjate.

Pentru a se putea replica, un vehicul are nevoie de două elemente principale și anume: a) o regiune din moleculă de DNA, echivalentă originii replicării DNA (notată prescurtat *ori*) care să fie recunoscută de către o proteină cu funcție de inițiator și b) să conțină gena pentru această proteină în aceeași moleculă (Boyer și colab., 1977). Aceiași autori definesc astfel caracteristicile principale ale unui vehicul ideal:

— să fie ușor de purificat și să existe în cantități suficiente pentru experimentare;

— să posede markeri genetici asociați moleculei lor, bine caracterizați, care să permită o ușoară selecționare a celulelor purtătoare a acestor vehicule;

— să posede un număr limitat de situsuri pentru enzimele de restricție, care să ofere posibilitatea scindării specifice a vehiculului, în scopul atașării de el a unor fragmente noi de DNA.

Odată ce un vehicul posedă cele două elemente principale arătate mai sus, el îndeplinește condițiile postulate de Jacob și colab. (1963) pentru un *replicon*, deci el se poate autoreplica. Funcția de vehicul sau de replicon o pot ocupa atât plasmidele bacteriene, cât și unele virusuri. În principiu, orice plasmidă sau, cum precizează Nathans (1977), orice acid nucleic viral care este infectant poate fi folosit ca vehicul. Totuși, în practică s-au introdus numai anumite plasmide și acizi nucleici virali, cum sînt plasmidele colicinogene (*Col E<sub>1</sub>*), colifagul  $\lambda$  și virusul SV40. Preferința pentru aceste vehicule a fost dictată de cunoașterea detaliată



a mapei lor fizice, fapt care facilitează folosirea lor pentru construirea de molecule de recombinanți.

Plasmidele și colifagul  $\lambda$  au marele avantaj de a se replica în celulele bacteriene, care — așa cum se cunoaște — au o rată rapidă de multiplicare. De aici rezultă posibilitatea multiplicării avantajoase a vehiculului, purtător al informației genetice noi, fapt esențial pentru producerea pe scară industrială a unui anumit produs biologic codificat de pasager. Aceasta deoarece pasagerul introdus în vehicul — indiferent de natura lui — ajunge sub controlul vehiculului care îl replică și îl exprimă ca o parte integrantă a moleculei sale. Rezultă că o plasmidă bacteriană, de exemplu, poate să multiplice și să exprime gena pentru insulină într-o cultură bacteriană, dacă în plasmida respectivă a fost introdusă gena insulinei. Acesta este principiul pe care se bazează obținerea unor produși biologic activi importanți prin tehnologia DNA recombinant.

Referitor la virusul SV40, precizăm că acidul său nucleic are proprietatea de a se integra în DNA celular. În consecință, el va putea fi folosit în viitorul apropiat ca vehicul pentru inserția de gene în cromozomul celulelor de mamifere (Nathans, 1977). Ca atare, el ar putea deveni un agent eficient pentru tratamentul unor maladii care au la bază tulburări metabolice datorate unor defecte genetice; atașarea de acest vehicul (lipsit însă de zona moleculară care induce transformarea celulară!) a genelor deficiente din genomul organismului bolnavilor respectivi și integrarea lui în genom ar putea deschide calea terapiei genice.

S-a amintit mai sus că DNA din virusul SV40 are o parte din molecula sa responsabilă de transformarea celulară și că această parte trebuie modificată în moleculă în momentul în care se pune problema utilizării lui ca vehicul pentru inserția de gene în genomul celular. S-a ajuns astfel la o situație mai generală și anume la pregătirea sau construcția vehiculului ideal pentru cercetările de tehnologie cu DNA recombinant.

Construcția unui vehicul ideal trebuie să țină cont de două condiții esențiale și anume: a) să se elimine din vehicul toate părțile neesențiale sau generatoare de efecte nedorite, astfel încât proprietățile sale de replicare să nu fie afectate și b) replicarea lui să fie dependentă de anumite condiții experimentale de creștere a celulelor în care se replică. Dacă prima condiție are justificarea menționată, a doua necesită unele precizări. După cum se știe, construcția unui vehicul se face în scopul multiplicării unei anumite informații genetice pe care în mod natural plasmida sau virusul nu o posedă inițial. Cum un vehicul poate multiplica orice fragment de DNA străin atașat de el, aceasta înseamnă că și inserția — chiar întâmplătoare — în vehicul a unei informații genetice nedorite să fie urmată atât de multiplicarea, cât și de diseminarea ei. Or, pentru a avea vehiculul sub controlul cercetătorului, el este astfel construit ca multiplicarea lui să se facă numai în condiții speciale de laborator.

Este deci vorba aici de o măsură de securitate pentru a împiedica bio-hazardul.

În continuare vor fi descrise caracteristicile principale ale vehiculelor utilizate în tehnologia DNA recombinant.

## V.1. Elemente extracromozomale. Plasmide bacteriene

În anul 1959, Ochiai și Akibe — în mod independent unul de altul — au raportat, în Japonia, un fenomen necunoscut pînă atunci și anume rezistența multiplă a bacteriilor enterice la medicamente (antibiotice), proprietate care poate fi transferată *in vitro* la bacterii susceptibile la medicamente. Investigarea acestui fenomen a pus în evidență existența în unele bacterii a unor *factori transmisibili de rezistență la medicamente* sau pe scurt *factori R* (Watanabe, 1963). Ulterior atît factorii *R*, cît și factorii de sex *F*, precum și alte componente bacteriene care nu sînt sub controlul genetic al cromozomilor au primit denumirea generală de *plasmide* sau *elemente extracromozomale*. Caracteristica esențială și comună a tuturor plasmidelor este capacitatea lor de propagare proprie, ca atare sau împreună cu oricare genă legată de ele. Clowes (1972) definește astfel o plasmidă: „un element care este separat fizic de cromozomul celular și este capabil de a se perpetua stabil în această stare”. Termenul de element extracromozomal este sinonim cu acela de plasmidă. El poate fi definit și ca un element neesențial pentru creșterea celulelor normale, putînd fi pierdut sau cîștigat de celule fără efect letal. Acele plasmide care au proprietatea de a ocupa un loc în cromozom se numesc *epizomi*. În timp ce o plasmidă poate sau nu poate fi un epizom, toți epizomii sînt plasmide. Întrucît definiția de epizom implică o relație genetică între plasmidă și celulele-gazdă, același element poate fi un epizom într-o celulă-gazdă și plasmidă într-o altă celulă.

Este important de precizat că cele mai multe gene ale plasmidelor par să nu aibă echivalenți cromozomali, de unde rezultă necesitatea evidentă de a face deosebirea între genele plasmidelor și ale cromozomilor, care uneori pot fi similare fenotipic, dar sînt total distincte din punct de vedere funcțional.

### V.1.1. Clasificarea plasmidelor

Pe baza proprietăților biologice pe care le prezintă, Cohen (1976) împarte plasmidele în nouă categorii, cu următoarele caracteristici:

- 1) prezintă abilitatea de a transfera material genetic prin conjugare ..... *F*, *R*<sub>1</sub>, *Col*<sub>1</sub>



- 2) produc bacteriocine ..... ColDF 13 (*Enterobacterium cloacae*), Col<sub>1</sub>
- 3) produc antibiotice, ..... SPC1 (plasmida din *Str. coelicolor*)
- 4) produc rezistență la metale grele (Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>) ..... pI258 (*S. aureus*), R<sub>6</sub>
- 5) produc rezistență la ultraviolete ..... Col Ib, R<sub>48</sub>
- 6) produc enterotoxine ..... Enterobacteriaceae
- 7) determină factorul de virulență (antigen hemolizina K<sub>88</sub>) ..... Col V, Hly
- 8) produc tumorigenicitate la plante ..... plasmida T1 (*Agrobacterium tumefaciens*)
- 9) determină restricție și modificare ..... producția de nuclează Eco RI și metilază (plasmida din *E. coli* RY13)

În ciuda diversității lor, s-au făcut unele generalizări privind clasificarea plasmidelor. Astfel, plasmidele au fost grupate în două tipuri majore: conjugative și neconjugative.

**V.1.1.1. Plasmide conjugative.** Se spune că o plasmidă este conjugativă sau este clasificată ca factor de sex dacă este autotransmisibilă de la o celulă bacteriană la alta (*conjugare*). Prezența plasmidelor de acest tip conferă proprietatea de donator celulelor care le posedă. Aceste celule donatoare sînt capabile să transfere plasmide sau alte informații genetice celulelor receptoare.

În general, plasmidele conjugative au masa moleculară mare, de aproximativ  $40-70 \times 10^6$  daltoni, dar mărimea lor este de obicei cuprinsă în domeniul  $17-200 \times 10^6$  daltoni.

Plasmidele conjugative se împart, la rîndul lor, în două categorii: *represate* și *derepresate*, pentru fertilitate. S-a stabilit că marea majoritate a plasmidelor existente în natură sînt represate, ceea ce înseamnă că acestea permit celulelor să transfere plasmida în proporție de numai 0,01%—1% din timp, în condițiile optime de laborator. În schimb, plasmidele derepresate permit tuturor celulelor donatoare să transfere plasmida.

**V.1.1.2. Plasmide neconjugative.** Aceste plasmide nu au capacitatea de a promova conjugarea. Dimensiunea lor este mică, cuprinsă între  $0,5-15 \times 10^6$  daltoni. Se găsesc în copii multiple per celulă. Dacă o plasmidă conjugativă este corezidentă cu o plasmidă neconjugativă, plasmida mai mică (deci cea neconjugativă) poate fi transferată (mobilizată) la o celulă receptoare în timpul conjugării.

Este important de reținut că numai plasmidele neconjugative pot fi întrebuințate pentru introducerea DNA străin în *E. coli* K12. Dintre

plasmidele care au primit avizul pentru a fi folosite ca vehicule în celulele-gazdă *EK1* sau *EK2* ( $\chi$  1776) amintim plasmidele *pMB9*, *pBR313*, *pBR322* și *pSC101* (v. pag. 130). Aceste plasmide au caracteristica comună de a fi transferate (mobilizate) cu o frecvență foarte scăzută în condiții nepermissive de laborator, ceea ce conferă un grad crescut de protecție biologică pentru experimentele de tehnologie a DNA recombinant.

### V.1.2. Compoziția fizică a plasmidelor

În 1961 Marmur și colab. aduc prima dovadă directă a naturii fizice a plasmidelor bacteriene. Autorii au transferat activitatea de fermentare a lactozei asociată cu factorul  $F'$  ( $F' lac^+$ ) de la o tulpină de *E. coli* la o tulpină de *Serratia marcescens* și au analizat DNA al tulpinii acceptoare. Ultracentrifugarea analitică în gradient de densitate de CsCl a arătat prezența unui vîrf de DNA caracteristic cromozomului tulpinii *S. marcescens* ( $\rho = 1,718 \text{ g/cm}^3$ ) și, ceea ce a fost surprinzător, un umăr corespunzător DNA din *E. coli* ( $\rho = 1,709 \text{ g/cm}^3$ ). Trebuie precizat că umărul nu a fost observat niciodată în tulpina parentală de *S. marcescens*, înaintea transferului de factor  $F$ .

Ulterior, Falkow și colab. (1964) au transferat factorul  $F' lac^+$  la o tulpină de *Proteus*. Prezența factorului a fost urmărită, alături de alte teste, și prin analiza DNA izolat din *Proteus* înainte și după transfer, precum și după un tratament considerat clasic prin care factorul  $F'$

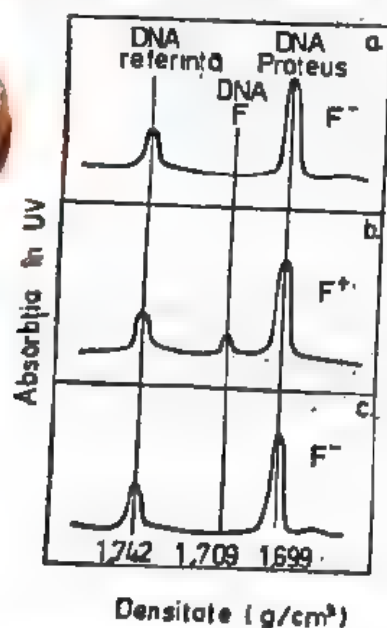


Fig. 34. Prezentarea grafică a profilelor de densitate a DNA din *Proteus* înainte (a) și după (b) transferul factorului  $F' lac^+$ , precum și a DNA din *Proteus* „vindecat” de factorul  $F'$  prin tratamentul cu acridinoranj (c). Pentru o bună identificare a benzilor de DNA, analiza a mai conținut și un DNA de referință cu o densitate mare ( $\rho = 1,742 \text{ g/cm}^3$ ) (după Falkow și colab., 1964).

a fost „vindecat” sau înlăturat cu ajutorul acridinoranjului. Figura 34 prezintă rezultatul analizei DNA: comportarea DNA din *Proteus* ( $\rho = 1,699 \text{ g/cm}^3$ ) în absența factorului  $F'$  și în prezența unui DNA de referință (DNA din *Bacillus subtilis* care are densitatea  $\rho = 1,742 \text{ g/cm}^3$ ) (fig. 34, a) și comportarea DNA din tulpina de *Proteus* căreia i s-a trans-



ferat factorul  $F'$  (fig. 34, b). Aşa cum rezultă din figură, DNA conţine un vîrf satelit separat, corespunzător factorului  $F'$ , la densitatea de  $1,709 \text{ g/cm}^3$ . Este important de remarcă că vîrful satelit nu a mai fost prezent atunci cînd factorul  $F'$  a fost „vindecat” de către acridinoranj (fig. 34, c). Aceste corectări au fundamentat ideea că factorul  $F'$  este constituit din DNA, idee care s-a generalizat apoi pentru toate plasmidele.

### V.1.3. Masele moleculare ale DNA plasmidic

Inițial, estimarea maselor moleculare ale DNA plasmidic s-a făcut pe preparate obținute prin metoda lui Marmur (1961). Condițiile oarecum drastice impuse de metodă, prin care se îndepărtează proteinele din DNA, determină însă fragmentarea moleculei de DNA în segmente cu masa moleculară de aproximativ  $10 \times 10^6$  daltoni. Odată cu introducerea unor metode mai blînde de extracție a DNA — cum a fost aceea preconizată de Hickson și colab. (1967) — s-a constatat că masele moleculare ale DNA plasmidic sînt uneori chiar mai mari decît  $100 \times 10^6$  daltoni. În esență, metoda aceasta constă în obținerea mai întîi a sferoplastelor, prin tratarea bacteriilor cu un amestec de lizozim, RN-ază și EDTA, în prezența sucrozei, urmată de tratamentul acestora cu un detergent de tipul DDS, pentru a produce liza celulară. În etapa finală a purificării, proteinele sînt îndepărtate prin tratamentul cu fenol tamponat, iar fenolul se elimină prin dializă.

Estimarea maselor moleculare ale DNA plasmidic se face, în principal, prin trei procedee: unul bazat pe constantele de sedimentare stabilite prin ultracentrifugare; al doilea pe determinările lungimii de contur a moleculei de DNA, efectuate cu microscopul electronic, iar al treilea prin determinarea mobilității electroforetice în gel de agaroză.

În primul caz, constantele de sedimentare se raportează la un DNA standard, care în cele mai multe cazuri este DNA din fagul  $\lambda$ , avînd masa moleculară de 30,8 Mdal (megadaltoni;  $1 \text{ Mdal} = 10^6 \text{ dal}$ ). În al doilea procedeu, masa moleculară se estimează din relația stabilită de Lang (1970) pentru DNA bicatenar, conform căreia  $1 \text{ nm} = 2,07 \text{ Mdal}$ . În ceea ce privește al treilea procedeu, care în ultimul timp a devenit cel mai folosit, el permite determinarea masei moleculare relative în raport cu molecule standard, aflate în aceeași conformație.

Datele actuale permit a se preciza că plasmidele au dimensiuni variabile, între 2 250 de nucleotide (masă moleculară de aproximativ 1,3 Mdal), dimensiune descrisă pentru plasmida minicirculară „criptică” a bacteriei *E. coli* 15 (Cozzarelli și colab., 1968) și 400 000 de perechi de nucleotide (masă moleculară de aproximativ 240 Mdal), dimensiunea pe care o ating plasmidele mai complexe ale factorilor de sex  $F'$  (Cohen, 1976). Valoarea dată de Cohen pare însă a fi excesiv de mare, dacă

se țin cont de tabelele publicate de Clowes (1972) pentru masele moleculare ale factorilor de sex  $F'$  în care cifrele variază între 35 și 75 Mdal. În tabelul 13 sînt redată masele moleculare ale unor plasmide.

Tabelul 13

Masele moleculare ale unor plasmide

Plasmida	Masa moleculară (Mdal)	Referința
Factori de sex ( $F$ și $F'$ )	$F$ 42	Freifelder (1968)
	$F'$ -gal 48	Freifelder (1968)
	$F'$ -lac 69	Freifelder (1968)
Factori colicino-genți ( $Col$ )	$Col E_1$ 4,8	Roth și Helinski (1967)
	$Col E_2$ 6,0	Bazaral și Helinski (1968)
	$Col E_3$ 6,0	Bazaral și Helinski (1968)
	$FVBtet$ 113	Hickson și colab. (1968)
Factori de rezistență ( $R$ )	$R_{15}$ 46	Nisoka și colab. (1970)
	$222/R_4$ 70	Nisoka și colab. (1970)
	$222/R_3W$ 69	Nisoka și colab. (1970)
	$R_1$ 59	Cohen și Miller (1964)

Precizăm că tabelul nu conține masele moleculare ale plasmidelor special construite pentru cercetările de tehnologie a DNA recombinant.

#### V.1.4. Conformațiile moleculare ale DNA plasmidic

În mod oarecum surprinzător, conformațiile moleculelor de DNA plasmidic sînt asemănătoare celor pe care le prezintă virusurile oncogene DNA: polioma, papiloma și SV40.

În mediu neutru, o primă conformație moleculară descrisă pentru DNA plasmidic este aceea de moleculă bicatenară circulară covalent închisă (CCI) sau, în termenii consacrați în literatură *covalently closed circular duplex molecule* (CCC). Caracteristic pentru această conformație este faptul că atunci cînd este izolată din celulă ea își asumă o formă „superîncolăcită” (*supercoil*), adică elicea dublă a DNA se răsucește suplimentar în jurul ei însăși. La această moleculă ambele catene sînt continui, fiind închise covalent (v. fig. 35,c).

A doua conformație pe care o poate avea o moleculă de DNA plasmidic este aceea de „duplex circular deschis” (CD) (*open circular duplex*) (OC). În acest caz molecula este circulară, avînd o catenă continuă, iar a doua discontinuă. Datorită discontinuității uneia din catene ea se mai numește și „cerc crestă” (*nicked circle*). În această conformație molecula de DNA nu se mai superîncolățește, motiv pentru care se numește și „relaxată” (fig. 35, b).

Prin scindarea (crestarea) catenei continui a moleculei de duplex circular deschis ea trece în cea de a treia conformație pe care o poate



avea molecula de DNA plasmidic și anume aceea de „duplex liniar” (fig. 35, a).

În mediu alcalin, cînd toate legăturile de hidrogen dintre baze se rup și catenele se desfac, moleculele *CCI* trec într-o conformație compactă, avînd coeficientul de sedimentare relativ (față de duplexul

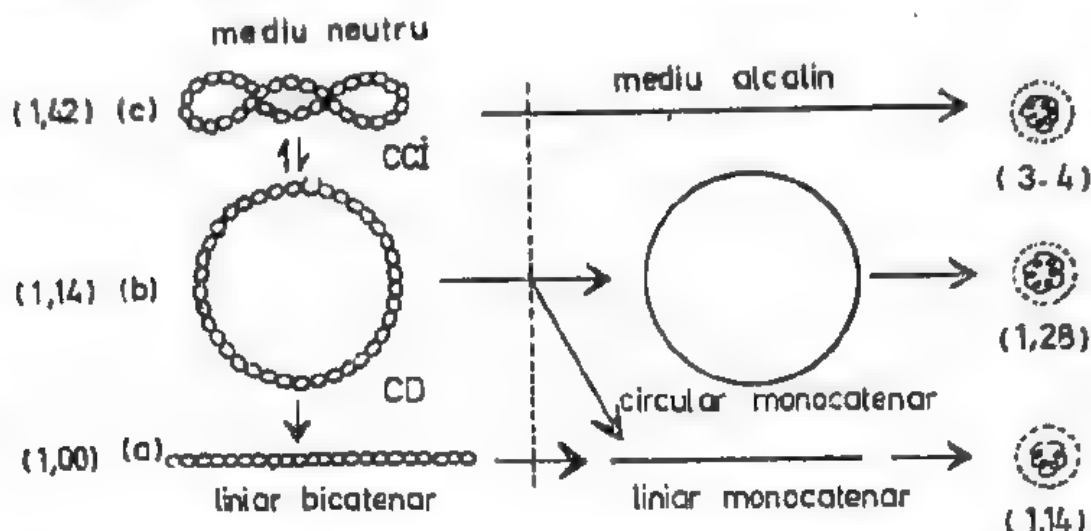


Fig. 35. Diferite conformații moleculare pe care le pot avea moleculele de DNA plasmidic sau DNA din virusurile oncogene SV40, polioma și papiloma în mediu neutru sau alcalin. În paranteză sînt prezentați coeficienții de sedimentare raportați la cel al moleculei de DNA bicatenar (duplex) liniar luat ca referință.

liniar, considerat etalon) crescut de 3—4 ori. Cele două catene ale moleculelor *CCI* fiind întrepătrunse nu se separă. În același mediu, moleculele duplex circulare deschise se denaturează, iar cele două catene ale sale se despart, una dă naștere la un cerc moncatenar cu catena continuă, avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,28, iar a doua devine moleculă moncatenară liniară avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,14.

Sub influența alcaliilor, duplexul liniar se desface în cele două catene liniare avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,14.

Trecerile pe care le suferă conformațiile DNA plasmidic în mediu neutru și alcalin sînt reprezentate schematic în fig. 35.

Din examinarea fig. 35 rezultă clar că atunci cînd se supun ultracentrifugării moleculele de DNA plasmidic, conformațiile lor pot fi ușor recunoscute după coeficientul de sedimentare caracteristic pe care îl prezintă. Moleculele care sedimentează cel mai rapid sînt cele aflate în conformația *CCI*, urmează apoi în ordine cele în conformație de cerc deschis, iar ultimele sedimentează moleculele liniare.

Cele trei conformații pot fi identificate rapid prin metoda electroforezei în gel de agaroză: moleculele *CCI* au mobilitatea electroforetică cea mai mare, iar moleculele *CD* — mobilitatea cea mai mică, formele liniare avînd o mobilitate intermediară (fig. 36). Trecerea moleculelor



Fig. 36. Electroforeza moleculelor circulare covalent închise (CC), circulate deschise (CD) și liniare ale plasmidelor pBR3.2, pSF2124, precum și a DNA din virusul SV40, puse în evidență prin electroforeză în gel de agaroză.

A) Coloana 1-a conține DNA CCI (spotul de jos) și DNA CD (spotul heterogen) ale plasmidului *pRR13*. Coloana a 2-a conține DNA CCI (spotul de jos) și DNA CD (spotul heterogen) ale plasmidului *pRR13*, iar coloana a 4-a DNA conținut al plasmidului *pRR13*. Formele, în care ale celor două plasmide s-au eluat prin încălzirea DNA CCI - CD (un material cu efectul de colare) 1 și 2) cu enzima de restricție *Eco RI*. Precizăm că ambele plasmide conțin un situs pentru *Eco RI*.



din conformația CCI (și CD) în cea liniară se face de obicei cu ajutorul enzimelor de restricție, cu condiția ca molecula de DNA în conformație CCI să aibă un singur situs pentru enzima respectivă.

### V.1.5. Calculul coeficienților de sedimentare a diferitelor conformații de DNA

Pentru moleculele de DNA aflate în aceeași conformație moleculară coeficienții de sedimentare (exprimați în unități Svedberg) se calculează din masele lor moleculare, cu ajutorul unor formule empirice, cum se va arăta în continuare.

Pentru moleculele de DNA aflate în conformație de duplex liniar coeficientul de sedimentare ( $S$ ) se deduce din formula:

$$S_{20,w}^0 = 2,8 + 0,00834 M^{0,47} \text{ (Freifelder, 1970)}$$

în care  $M$  este masa moleculară a DNA.

În cazul duplexului circular deschis formula devine:

$$S_{20,w}^0 = 2,7 + 0,0175 M^{0,445} \text{ (Hudson și colab. 1968)}$$

iar pentru duplexul circular covalent închis:

$$S_{20,w}^0 = 7,44 + 0,00243 M^{0,58} \text{ (Hudson și colab. 1968)}.$$

Calculând raportul coeficienților de sedimentare a DNA aflat în diferite forme conformaționale în funcție de masele lor moleculare, Freifelder (1970) a constatat că acesta variază după anumite curbe specifice (fig. 37).

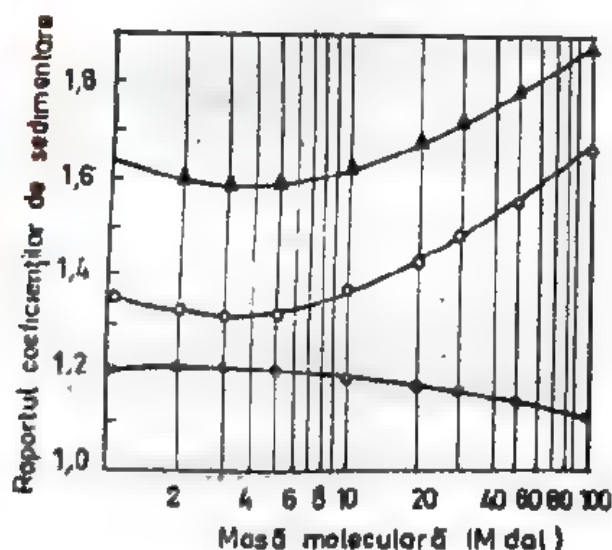


Fig. 37. Variația raportului coeficienților de sedimentare a moleculelor de DNA aflate în diferite conformații moleculare în funcție de masele lor moleculare (după Freifelder, 1970).

Valoarea absolută a coeficientului de sedimentare a unui DNA aflat în conformație de cerc deschis (CD) sau cerc covalent închis (CCI) poate fi determinată printr-o cosedimentare a DNA, respectiv cu un DNA standard, aplicându-se cunoscuta formulă:

$$S_1/S_2 = D_1/D_2$$

în care  $S_1$  și  $S_2$  sînt coeficienții de sedimentare, iar  $D_1$  și  $D_2$  distanțele pe care le parcurg în cîmpul centrifugal de la menisc DNA standard și DNA al cărui coeficient de sedimentare urmează să fie determinat.

Pentru exemplificare, în fig. 38 se prezintă aspectul general al unei analize de ultracentrifugare în care s-a cosedimentat un amestec de DNA.

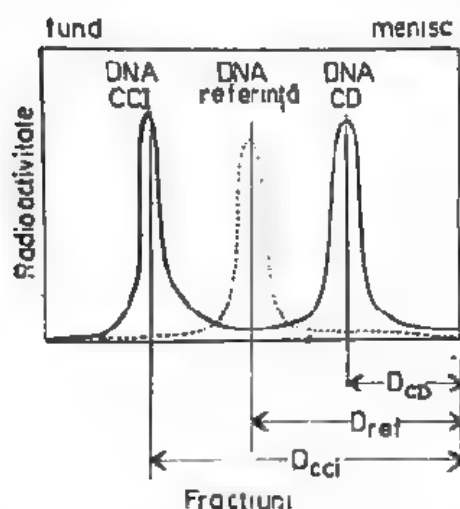


Fig. 38. Comportarea moleculelor CCI și CD în cursul ultracentrifugării (după Clowes, 1972).

conținînd molecule CCI și CD (avînd coeficienții de sedimentare necunoscuți) împreună cu un DNA standard.

Coeficientul de sedimentare al formei liniare a unui DNA ( $S_3$ ) se poate stabili aproximativ prin divizarea valorii lui  $S_1$  prin valoarea rezultată din raportul CD: liniar, corespunzătoare masei moleculare aproximative stabilite în fig. 38.

Calculul masei moleculare a unui DNA în conformația de duplex liniar se face după cum urmează.

Considerînd că  $S_2$  este coeficientul de sedimentare, iar  $M_2$  masa moleculară a unui DNA de referință, masa moleculară a unui DNA în formă liniară poate fi estimată din formula prezentată de Burgi și Hershey (1963):

$$\frac{S_2}{S_3} = \left( \frac{M_2}{M_1} \right)^{0,38}$$

în care  $S_3$  este coeficientul de sedimentare a DNA în formă liniară (stabilit prin aproximație după cum s-a arătat mai sus), iar  $M_3$  masa moleculară a DNA liniar.

Exponentul 0,38 este un număr empiric, stabilit pe baza determinării maselor moleculare ( $M$ ) a mai mulți DNA.

### V.1.6. Replicarea DNA plasmidic

De la început trebuie precizat că în momentul de față nu există un mecanism general valabil pentru replicarea tuturor tipurilor de plasmide. Mecanismele propuse se bazează pe observațiile experimentale



obținute pe anumite tipuri de plasmide. Ca atare, aceste modele trebuie luate în considerare specific numai pentru plasmidele respective, pînă cînd se vor aduna și alte date experimentale care să asigure generalizarea lor.

Cele mai multe modele de replicare a plasmidelor își au originea în primul model propus de Jacob și colab., 1963. Multe din aspectele acestui model au fost eliminate, dar ideile sale de bază rămîn încă valabile. Pentru moleculele de DNA circulare, capabile a se autoreplica (cazul plasmidelor), se presupune că există două situsuri care controlează replicarea lor. Un situs este reprezentat de gena reglatoare, care produce o substanță difuzabilă denumită „inițiator”. Aceasta acționează asupra celui de al doilea situs denumit „operatorul” replicării sau pe scurt „replicator”, care determină inițierea replicării din locul său.

Pentru a explica replicarea și moștenirea stabilă a proprietăților plasmidelor de tip *F*, de exemplu, s-a presupus că repliconul acestei plasmide se atașează de un loc al celulei de care se atașează și cromozomul. S-a sugerat că acest loc de atașare este situat pe membrana celulară, care controlează semnalul de inițiere a replicării atât pentru cromozom, cît și pentru plasmidă.

În timpul fiecărei generații celulare, locul de pe membrană împreună cu plasmidele atașate se duplică astfel încît la diviziunea celulară se produce o copie a locului de pe membrană împreună cu plasmida(ele) și cromozomul(mii) atașat la fiecare celulă-fiică. Astfel se asigură moștenirea stabilă a tuturor caracterelor celulare, controlate atât de plasmide, cît și de cromozomi (Clowes, 1972).

În ultimul timp, atenția cercetătorilor care studiază replicarea moleculelor circulare covalente închise (CCI) în diferite sisteme biologice s-a concentrat asupra a patru intermediari de replicare posibili, pe care îi prezentăm în fig. 39.

Mecanismele propuse pentru replicarea DNA circular au o caracteristică comună și anume scindarea cercului în timpul replicării cu sco-

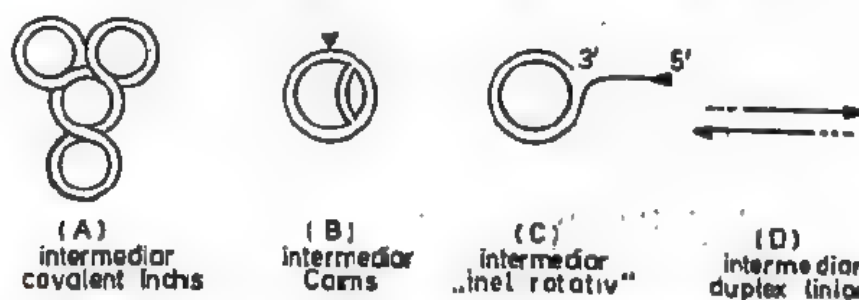


Fig. 39. Patru intermediari posibili care pot apare în cursul multiplicării DNA plasmidic.

pul de a permite separarea celor două catene parentale. Diferențele care există între mecanisme constau atât în natura scindării, cît și a primerului necesar pentru sinteza catenelor-fiice. În cazul intermediarului A din fig. 39, care este o moleculă circulară închisă, replicarea presupune

existența unor sciziuni și închideri periodice, alături de schimbarea răsucirii moleculei. Astfel de procese ale intermediarului de replicare au fost descrise pentru o serie de molecule de DNA circulare de tipul DNA al virusului SV40, polioma și DNA mitocondrial (Kasamatsu și Vinograd, 1974). Intermediarul *B* prezintă caracteristica „furcii” de replicare, sugerată de Cairns și posedă o sciziune permanentă. În plus, pentru replicare, el are nevoie de un primer (la fel ca și intermediarul *A*) care să inițieze sinteza DNA. Al treilea model de replicare, bazat pe intermediarul *C* de tipul „inelului rotativ”, implică existența unei sciziuni stabile pentru adăugarea deoxiribonucleotidelor noi la catenele parentale. În sfârșit, intermediarul *D* este o moleculă de DNA bicatenară liniară rezultată din scindarea DNA circular conform mecanismului descris anterior.

Majoritatea cercetătorilor angajați în studiul replicării și transferului plasmidelor preferă modelul de replicare bazat pe sistemul inelului rotativ. În acest model ipotetic se consideră că o proteină inițiator produce o sciziune în DNA plasmidic *CCI*, convertindu-l într-o formă circulară deschisă. Catena ruptă, astfel produsă, poate fi transferată începând cu capătul ei 5'-terminal. În schimb, celălalt capăt (3'—OH), rămâne fixat prin legături de hidrogen de catena intactă, circulară, a DNA și poate astfel iniția sinteza continuă a catenei de DNA care să o înlocuiască pe cea transferată. Acest mecanism permite transferul continuu al unei singure catene de DNA plasmidic celulelor recipiente, astfel ca cele mai multe dintre ele să primească DNA în exces față de lungimea DNA plasmidic monocatenar monomeric. Transferul unei lungimi mai mari de DNA este necesar pentru păstrarea informației genetice în timpul reformării stării bicatenare. Prin urmare, în forma sa cea mai simplă, modelul inelului rotativ necesită existența în celula donoare a unei proteine-inițiator cu activitate de sciziune, a unei DNA-polimeraze și a unei DNA-ligaze pentru a închide ruperea monocatenei după terminarea transferului.

În continuare se va prezenta un model de replicare și transfer al DNA aparținând plasmidelor de tip *R* și *F*, care permite transferul discontinuu și ciclic al DNA plasmidic monocatenar monomeric, posedând capacitatea de a se circulariza în celula recipientă după conversia în formă bicatenară.

Modelul a fost propus de Curtiss și Fenwick, în 1975. El presupune că DNA *CCI* poate fi convertit într-o formă bicatenară liniară cu capete coezive, iar replicarea și transferul DNA se produc pe această matrice. Capetele coezive conțin aproximativ 10—20 de nucleotide, dar pentru motive de simplificare se indică numai cinci perechi de nucleotide.

În fig. 40, *A* este reprezentat DNA plasmidic în stare de repaus, așa cum se găsește în citoplasmă. În momentul în care această moleculă ajunge în contact cu un receptor adecvat ea se asociază cu membrana interioară, iar ambele sale catene sînt scindate pentru a da naștere

la structura circulară deschisă arătată în fig. 40, B. Molecula aceasta poate să-și asume o conformație liniară bicatenară având capetele monocatenare (fig. 40, c). Datorită unei DNA-polimeraze, capetele monocatenare vor deveni și ele bicatenare, astfel că toată molecula se trans-

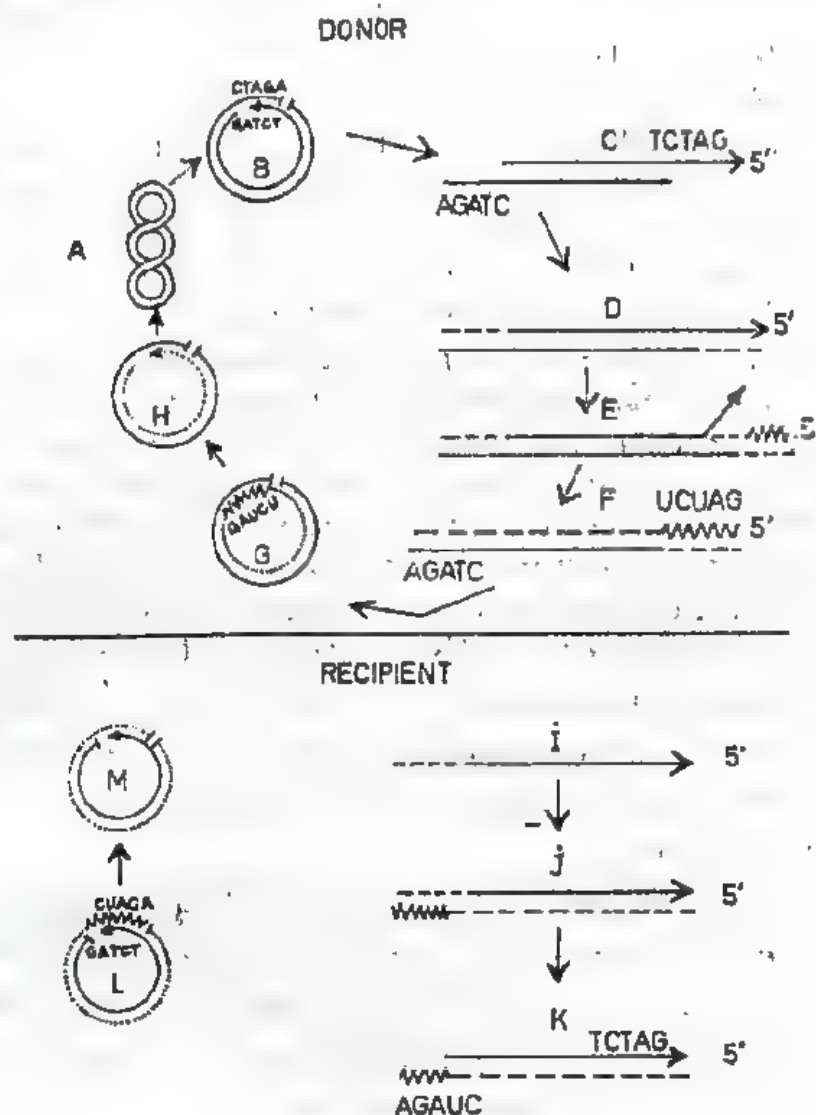


Fig. 40. Modelul replicării și al transferului DNA plasmidic utilizând DNA liniar ca matriță (după Curtiss și Fennick, 1975).

formă într-un duplex liniar bicatenar (fig. 40, D). Se consideră că moleculele de acest fel se acumulează pe membrana celulară interioară.

În continuare, se postulează sinteza unui RNA „primer” la capătul 5'-terminal (fig. 40, E). Fixarea RNA-polimerazei se face în zona capătului coeziv, iar secvența nucleotidelor din acest loc trebuie să conțină situsul de inițiere a sintezei pentru RNA „primer”. Într-o altă variantă ar exista o proteină-inițiator la capătul 5'-terminal, care ar specifica locul de fixare a RNA-polimerazei. Odată ce se sintetizează catena complementară, o catenă de DNA plasmidic se transferă la o celulă recipientă (fig. 40, I), iar molecula bicatenară liniară rămîne



atașată de membrana celulară a celulei donoare. În această etapă se iau în considerare două posibilități pentru reformarea ca donor a DNA plasmidic circular.

Prima dintre acestea, ilustrată în fig. 40, *G—H*, presupune că o exonuclează digerează capătul 3' al duplexului pentru a forma o moleculă circulară deschisă, păstrând RNA „primer” (fig. 40, *G*), care este apoi îndepărtat și înlocuit de DNA (fig. 40, *H*).

A doua posibilitate ar fi ca o exonuclează să digere capătul 5' al moleculei, formând o structură circulară deschisă de DNA plasmidic, fără ca acesta să conțină RNA. Indiferent de alternativa prin care a luat naștere DNA circular deschis, în final acesta este convertit în formă CCI (fig. 40, *A*), așa cum se află el în citoplasmă.

Trecând acum la evenimentele din celula recipientă, modelul descris presupune că DNA plasmidic monocatenar transferat de la donor se atașează de membrana celulară internă (fig. 40, *I*), loc în care, cu ajutorul unui RNA „primer”, se sintetizează catena complementară a DNA plasmidic (fig. 40, *J*). În continuare, circularizarea DNA plasmidic în celula recipient presupune acțiunea unei exonucleaze, care digerează nucleotidele 3' pentru a forma capetele coezive. Se formează astfel întâi o moleculă circulară deschisă conținând RNA „primer” (fig. 40, *L*), care este convertită într-o moleculă circulară deschisă, iar RNA „primer” este înlocuit cu segmentul corespunzător de DNA (fig. 40, *M*). În final, această moleculă trece în DNA CCI, formă în care el se găsește liber în citoplasmă (v. fig. 40, *A*).

Modelul pentru replicarea și transferul DNA plasmidic prezentat în fig. 40 se bazează în principal pe rolul DNA liniar bicatenar ca intermediar de replicare. Alegerea acestui intermediar s-a făcut pe baza observației că mulți DNA fagici ciclici au structură bicatenară liniară atât în timpul replicării, cât și într-o bună parte din ciclul lor de viață.

**V.1.6.1. Rolul complexilor de relaxare în replicarea DNA plasmidic.** Procesele biochimice care au loc la originea replicării DNA plasmidic sînt insuficient de cunoscute în momentul de față. Un fapt este însă clar și anume că scindarea uneia sau a ambelor catene de DNA trebuie să se realizeze în timpul replicării cu scopul de a permite dezrăsucirea și separarea catenelor nou scindate. Un candidat pentru această funcție de scindare este complexul de relaxare a DNA plasmidic superîncolăcit, descris pentru plasmidele *Col*, *R* și factorul de sex *F*.

Proprietatea principală a complexului de relaxare a DNA plasmidic izolat din celule de *E. coli* este conversia DNA plasmidic superîncolăcit la o formă circulară deschisă.

Analiza proteinelor din complexul de relaxare a pus în evidență trei componente cu masele moleculare relative de 60 000, 16 000 și 11 000. Este de reținut faptul că după tratamentul cu DDS al complexului de relaxare, proteina de 60 000 daltoni rămâne asociată cu catena scindată a DNA circular deschis, ceea ce sugerează că această proteină este legată covalent de catena de DNA. Se consideră că proteina de 60 000

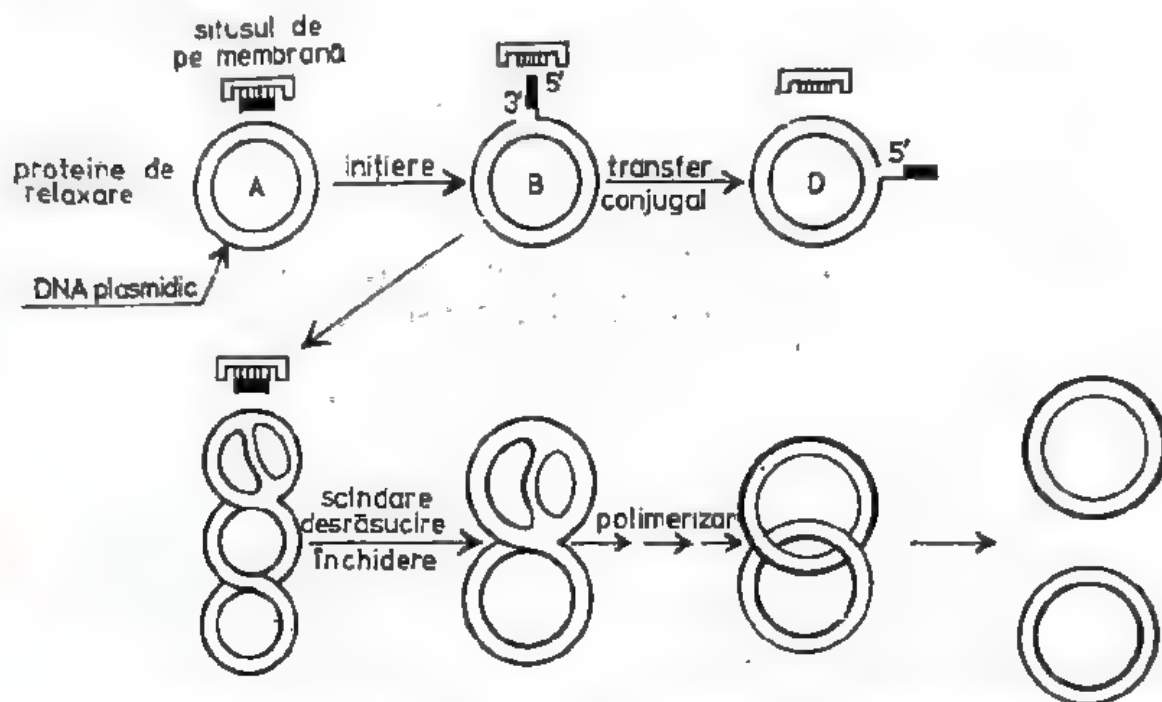


Fig. 41. Prezentarea schematică a rolului complexului de relaxare în replicarea și transferul DNA plasmidic (după Helinski și colab., 1974).

ar putea avea două activități: una de endonuclează și alta de transferază. În ceea ce privește celelalte două proteine, ambele sau numai una dintre ele ar putea avea funcția unui represor al activității endonucleazice a proteinei de 60 000 daltoni (Helinski și colab., 1974).

Rolul posibil al complexului de relaxare în replicarea și transferul conjugal al DNA plasmidic este prezentat în fig. 41. În acest model se propun mai multe funcții pentru complexul de relaxare și anume: promovează asocierea DNA plasmidic cu situsul de replicare de pe membrană (A), catalizează atât scindarea unei catene a DNA plasmidic în locul specificat de către un „semnal”, cât și formarea legăturii covalente între componenta proteică și capătul 5'-terminal al catenei scindate (B), închide catena scindată după dezrăsucirea catenelor de DNA (C), facilitează transferul catenei scindate în celula recipientă în timpul conjugării bacteriene (*bacterial motion*) (D).

Se consideră că legarea proteinei de DNA mai are și rolul de a determina conservarea conținutului ridicat de energie a legăturii fosfodiesterice scindate, de a proteja catena scindată de acțiunea exonucleazelor și de a facilita transferul DNA plasmidic la celula recipientă.

### V.1.7. Mobilizarea (transferul) plasmidelor curent folosite în tehnologia DNA recombinant

Cercetări curente au arătat că mobilizarea plasmidelor nu se face accidental sau printr-un proces pasiv. Întrucât plasmidele *Col E<sub>1</sub>* și unele derivate ale sale ca *pMB9*, *RSF2124*, *pBR313* și altele sînt curent folosite ca vectori pentru a introduce DNA străin în *E. coli*, se va prezenta mecanismul mobilizării acestui tip de plasmidă.

De obicei, *Col E<sub>1</sub>* (masa moleculară  $4,2 \times 10^6$  daltoni), care codifică producția de colicină *E<sub>1</sub>*, este mobilizată cu o eficiență mai mare de 50% de către factorul de sex *F*, pentru că peste jumătate din celulele receptoare care primesc *F* conțin și *Col E<sub>1</sub>*.

Conform unor date noi, *Col E<sub>1</sub>* conține o zonă moleculară clar definită care este implicată în mobilizarea plasmidei (fig. 42). Atît inser-

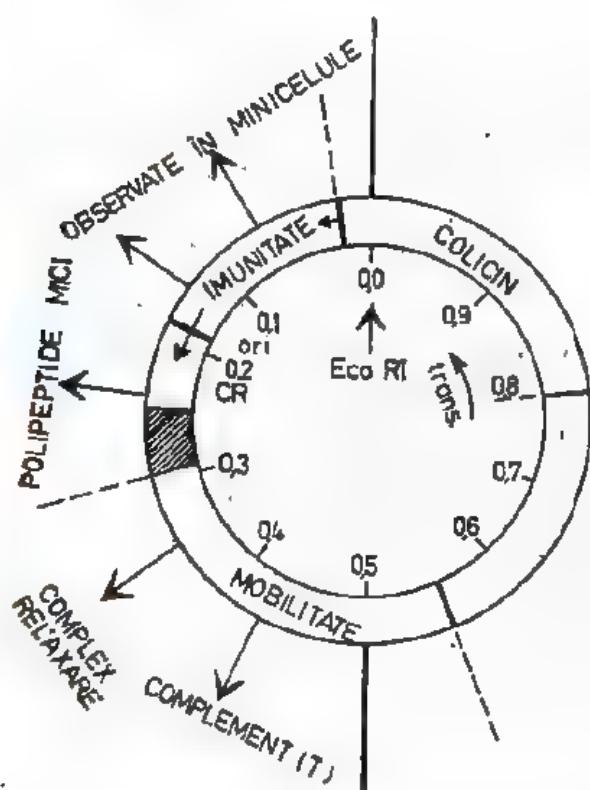


Fig. 42. Harta funcțională a plasmidei *Col E<sub>1</sub>* ( $4,5 \cdot 10^6$  daltoni).

țiile, cît și delețiile din aceste regiuni conduc la apariția de fenotipuri (*mob<sup>-</sup>*): mai puțin de 1 din  $10^5$  recipienți primesc o plasmidă *Col E<sub>1</sub>* *mob<sup>-</sup>* față de *Col E<sub>1</sub>* *mob<sup>+</sup>*.

Inserțiile lângă poziția 0,27 (zona hașurată din fig. 42) în cazul plasmidei *RSF2124*, îi modifică mobilitatea. Mutanții *Col E<sub>1</sub>* *mob<sup>-</sup>* au cantități mici de complex de relaxare (complex proteic găsit în DNA *Col E<sub>1</sub>*) capabil de a introduce o creștătură într-o catenă de DNA plasmidic. Această observație sugerează rolul complexului de relaxare în procesul de mobilizare.



(1—3 mM) (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967) sau  $Mn^{2+}$  (0,2—1,0 mM) (Zimmerman și colab., 1967).

Concentrația optimă de ioni  $Mg^{2+}$  este de 10 mM; la 3 și la 30 mM  $Mg^{2+}$  se constată 35% și, respectiv 80% din activitatea maximă. Ioni de  $Mn^{2+}$  îi pot înlocui pe cei de  $Mg^{2+}$  numai parțial. Concentrația optimă de  $Mn^{2+}$  10 mM restabilește doar 25% din activitatea manifestată în prezența unei concentrații identice de ioni  $Mg^{2+}$ . Exprimarea activității DNA-ligazei T4 necesită și prezența ditiotreitului, omiterea lui reducând activitatea enzimatică cu 75%. Înlocuirea ditiotreitului cu  $\beta$ -mercaptoetanol duce la o scădere cu 60% a activității acestei enzime (Weiss, 1971). Încă nu este complet elucidat rolul  $Ca^{2+}$  în cursul reacției și există controverse asupra acestui punct (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967).

#### IV.3.4. pH optim și stabilitate

În tampon Tris 66 mM-HCl, pH-ul optim de desfășurare a reacției ligazice este de 7,2—7,8. La pH 6,9 enzima mai prezintă doar 46%, iar la pH 8,0 doar 65% din activitatea la pH 7,6 (Weiss, 1971).

Enzima purificată este activă într-un domeniu de pH relativ larg (6,5—9,5). Activitatea de legare a DNA scade rapid în medii cu tărie ionică scăzută ( $< 40$  mM). Frațiunile de enzimă purificată se inactivează lent chiar în medii cu tărie ionică moderată (0,1 M) și chiar dacă sînt păstrate în glicerol la  $-5^{\circ}C$ , fenomen cărui Zimmerman și Oshinsky (1969) i-au dat următoarea explicație: enzima ar putea exista în trei forme (una complet activă *I*, a doua cu afinitate mai scăzută pentru substratul de DNA *II* și o a treia lipsită de activitate *III*). Inactivarea s-ar datora în principal trecerii formei *I* în *II* și apoi în *III*. Adăugarea de serumalbumină bovină (concentrație finală 0,1%) la soluțiile de DNA-ligază previne inactivarea în medii de tărie ionică moderată. Încălzirea enzimei timp de 5 minute la  $60^{\circ}C$  provoacă inactivarea ei totală.

Spre deosebire de *E. coli* DNA-ligaza, enzima de legare izolată din *E. coli* infectată cu bacteriofagul T4 s-a dovedit mai stabilă: după o păstrare de cca 6 luni la  $0^{\circ}C$  se înregistrează o pierdere de aproximativ 50% din activitate, dar dacă probelor enzimatică li se adaugă 50% glicerol se pot păstra pînă la șase luni, la  $-15^{\circ}C$ , fără o pierdere semnificativă a activității ( $< 10\%$ ) (Weiss, 1971).

#### IV.3.5. Temperatura optimă

Viteza reacției enzimatică este mult influențată de temperatură: la  $0^{\circ}C$ ,  $10^{\circ}C$  și  $20^{\circ}C$  se observă doar 10, 20 și, respectiv 55% din viteza la  $37^{\circ}C$ ; la  $45^{\circ}C$  se regăsește doar 20% din activitatea la  $37^{\circ}C$  și se observă inactivarea ireversibilă a enzimei.

#### IV.4. Izolarea și purificarea DNA-ligazelor

Pentru izolarea și purificarea ligazelor au fost puse la punct mai multe metode, în general greoaie și laborioase, comportând un număr variabil de etape, dintre care nu lipsesc însă precipitarea cu sulfat de amoniu, pentru îndepărtarea excesului de proteine celulare, și cromatografia pe coloană de DEAE-celuloză în gradient de săruri, care are drept scop separarea ligazelor de enzimele cu acțiune exonucleazică, ce eluează la alte concentrații saline, mai mici.

În cazul *E. coli* DNA-ligazei, Olivera (1971) dă următoarea schemă de izolare și purificare (tabelul 9):

Tabelul 9

Purificarea *E. coli* DNA-ligazei (după Olivera, 1971)

Fracțiunea	Volumul total (ml)	Activitatea totală (unit.)	Activitatea specifică (unit./mg proteină)
I. Extract celular bacterian	172	8 680	2,4
II. Precipitare cu streptomycină	735	(3 620)*	(2,6)*
III. Precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	32	5 040	8,1
IV. Cromatografie pe DEAE-celuloză	38	2 800	75
V. Cromatografie pe fosfo-celuloză	35	1 022	1575 (12% din activitatea inițială)

\* Streptomicina reziduală inhibă reacția de testare a activității ligazice, dând rezultate false în această etapă.

Metoda propusă a permis o purificare de 650 ori a enzimei.

Spargerea celulelor pentru obținerea extractului se realizează prin ultrasonicare. Resturile celulare se îndepărtează prin centrifugare, iar la supernatant se adaugă streptomycină, pentru îndepărtarea acizilor nucleici înalt polimerizați. Se centrifughează, iar noul supernatant care rezultă se tratează imediat cu sulfat de amoniu; se obține astfel fracțiunea III, care în continuare, se supune cromatografiei pe coloană de DEAE-celuloză. Eluția se face în gradient de săruri. Fracțiunea enzimatică activă suferă o nouă cromatografie, pe fosfo-celuloză. Noile fracțiuni în care eluează enzima se unifică și se concentrează prin dializă contra sucroză solidă. În acest mod se recuperează cca 75% din activitatea enzimei cuprinsă în fracțiunea V.

În extractele celulare enzima poate exista sub formă liberă sau legată ca adenilatligază. Cromatografia pe fosfo-celuloză este ineficace dacă enzima este legată, deoarece această formă nu se adsoarbe bine

pe fosfoceluloză; de aceea se recomandă ca tampoanele de lucru să conțină EDTA, care determină ca enzima să existe în special sub formă liberă.

Un procedeu analog de purificare, cu mici diferențe, au folosit Weiss și colab. (1968) și Weiss (1971) în cazul DNA-ligazei T4 (tabelul 10):

Tabelul 10

## Purificarea DNA ligazei T4 (după Weiss și colab., 1968)

Etapa	Activitate		Proteină (mg/ml)	Rendament (%)
	totală (unit. $\times 10^{-3}$ )	specifică (unit./mg prot.)		
I. Extract celular bacterian	153	11,6	11,4	100
II. Precipitare cu streptomycină	98	2,0	5,0	64
III. Precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	48	2,8	15,2	31
IV. Cromatografie pe DEAE-celuloză I	38	3,6	3,5	25
V. Cromatografie pe DEAE-celuloză II	16 (24)	14 (21)	0,15	10
VI. Cromatografie pe fosfoceluloză	9 (14)	—	0,01	6
VII. Concentrare	8 (12)	1700(2500)	0,08	5

Fracțiunea VII — eluatul de pe fosfoceluloză, concentrat — a fost purificată de cca 1000 ori față de produsul inițial.

Recent, Moore și James (1976) au simplificat metoda propusă în 1968 de Weiss și colab. (1968), ceea ce a ușurat și urmărirea activității enzimatică pe parcursul procesului de purificare. Ei au folosit schema din tabelul 11:

Tabelul 11

## Purificarea DNA-ligazei T4 (după Moore și James, 1976)

Fracțiune	Volum (ml)	Proteina (mg/ml)	Proteina totală (mg)	Activitate (unit. $\times 10^{-3}$ )
I. Extract celular total (Precipitare cu streptomycină)	400	26,5	10600	—
II. Precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	4,6	460	—
III. Eluat de pe fosfoceluloză	255	0,15	38	3,6
IV. Eluat de pe DEAE-celuloză	250	0,043	11,3	1,9
V. Concentrat cu glicerol	68	0,16	10,9	1,7

De reținut inversarea ordinei în care se face cromatografia pe fosfoceluloză: în procedeul propus de Weiss și colab. (1968) aceasta urma separării pe DEAE-celuloză; de asemenea, s-a renunțat la una dintre cele două separări pe DEAE-celuloză (compară cu tabelul 10).



Folosind tehnologia DNA recombinant, Panasenکو și colab. (1977) au construit un hibrid de *E. coli* și bacteriofag  $\lambda$ , hibrid care conține gena *E. coli* DNA-ligazei. În acest caz, bacteriofagul  $\lambda$  a fost folosit ca vehicul pentru amplificarea genelor; s-a reușit o creștere de cca 500 ori a activității ligazei în acest lizogen stabil. În extractele celulare bacteriene infectate cu acest recombinant, ligaza ajunge să reprezinte cca 5% din proteinele celulare, ceea ce ușurează considerabil procesul de purificare a enzimei, pentru care Panasenکو și colab. (1978) propun următoarea schemă (tabelul 12):

Tabelul 12

Purificarea DNA-ligazei din recombinantul *E. coli* 594 *gt4* *lop* 11 *lig*<sup>+</sup>*S7* (Panasenکو și colab., 1978)

Etapa	Proteină (mg/ml)	Activitate		Rendament %
		totală (unit. $\times 10^{-3}$ )	specifică (unit./mg prot.)	
I. Extract celular	21	4,7	75	(100)
II. Precipitare cu Polymix P	—	5,4	—	112
III. Precipitare cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	11,8	4,4	375	94
IV. Cromatografie pe fosfoce- luloză	0,013	2,0	6000	43
Concentrarea fracțiunii IV	7,0	2,1	6300	44

Metoda permite obținerea unei enzime cu o puritate mai mare de 95%, sub forma unui pic foarte strâns la cromatografia pe fosfoceluloză (fig. 28).

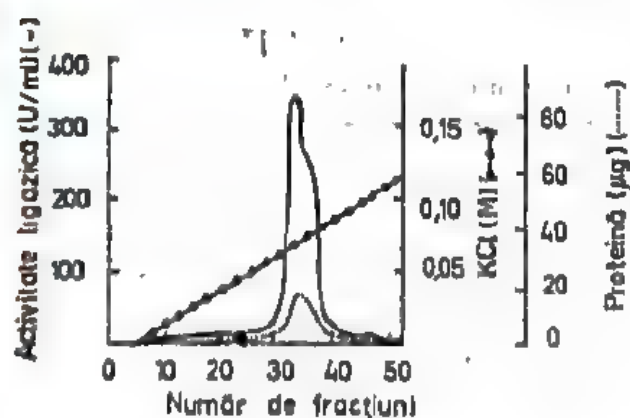


Fig. 28. Cromatografia pe fosfoceluloză a fracțiunii a III-a, cu obținere de DNA-ligază pură (după Panasenکو și colab., 1978).

#### IV.5. Testarea activității DNA-ligaze

Activitatea DNA-ligazelor se exprimă în unități. Pentru unitatea de DNA-ligază *T4*, Weiss și colab. (1968) dau următoarea definiție: unitatea este acea cantitate de ligază care catalizează în 20 minute

conversia unui picomol \* de  $^{32}\text{P}$ -fosfomonoesteri într-o formă rezistentă la acțiunea fosfatazei alcaline, iar Kleppe și colab. (1970) aduc unele mici modificări de enunț: unitatea este acea cantitate de enzimă care catalizează transformarea într-un minut a unui pM de capete  $^{32}\text{P}$ -5'-fosfat din  $\text{dT}_{10}$  la o formă nesusceptibilă la acțiunea fosfatazei alcaline bacteriene, în condiții standard (Gupta și colab., 1968).

Pentru testarea activității ligazice s-au descris patru clase majore de reacții și anume:

A. formarea adenilatligazei, intermediar acidoinsolubil, prin reacția dintre enzima liberă și  $\text{NAD}^+$  marcat la restul de adenină (Zimmerman și Oshinsky, 1969);

B. conversia unui DNA liniar la o formă circulară și detectarea lui fie prin: a) proprietăți de sedimentare alterate (Geffer și colab., 1967; Gellert, 1967), fie prin b) absența susceptibilității la acțiunea exonucleazelor (Modrich și Lehman, 1970; Olivera și colab., 1968) sau prin alte metode;

C. conversia unui DNA denaturat la o formă renaturabilă și detectarea DNA nativ prin adsorbția sa selectivă pe hidroxiapatită (Zimmerman și colab., 1967);

D. conversia capetelor 5'-fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați, nesusceptibili la acțiunea fosfatazei alcaline de origine bacteriană (Olivera și Lehman, 1967a; Weiss și Richardson, 1967).

Toate aceste metode sînt general valabile pentru testarea oricărei activități ligazice, cu excepția primei grupe de reacții (A), care nu se poate aplica decît acelor DNA-ligaze care — pentru a-și desfășura acțiunea — au nevoie de prezența  $\text{NAD}^+$  drept cofactor.

Metoda A. folosește cel mai simplu substrat; totuși nu se poate folosi decît după ce probele au fost dializate, pentru îndepărtarea  $\text{NAD}^+$  endogen. Metodele B. și C. folosesc drept substrat DNA de bacteriofag  $\lambda$  (sau oricare DNA bacteriofagic cu o structură similară). Dacă se urmărește testarea unui număr mare de probe — cazul procesului de izolare și purificare a enzimei — metodele acestea se dovedesc greoaie. În plus, metoda B. a) este deosebit de sensibilă la prezența endonucleazelor care ar putea impurifica preparatele de ligază. Metodele B. a) și D. sînt convenabile pentru a fi folosite cînd este nevoie să se facă screening-ul unui număr mare de probe. Există și aici un inconvenient și anume exonucleaza cu care se lucrează (metoda B. b)) trebuie să fie lipsită de activitate endonucleazică. Pentru a da rezultate bune, metoda D. necesită un  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  cu o activitate specifică ridicată, precum și o polinucleotidkinază cu un înalt grad de puritate.

În continuare se vor analiza pe rînd cîteva din grupele de metode de interes general, cu aplicabilitate pentru toate tipurile de ligază, deci grupele B., C., D.

\* 1 picomol (pM) =  $10^{-12}$  moli

### IV.5.1. Conversia DNA liniar la forma CCI

Această conversie se poate pune în evidență prin diverse mijloace.

**IV.5.1.1. Ultracentrifugare.** Ca urmare a acțiunii ligazice asupra formelor liniare de DNA (de natură bacteriofagică, de exemplu  $\lambda$  sau T7) apar forme CCI DNA, cu proprietăți de sedimentare în gradient de densitate deosebite și anume: formele CCI prezintă o densitate mai mare decât cele liniare. DNA bacteriofagici amintiți mai sus au la capetele structurii lor bicatenare regiuni monocatenare complementare; acestea pot interacționa fie intracatenar, cu formare de molecule circulare, legate prin punți de hidrogen, fie intercatenar și atunci apar dimeri sau alți oligomeri, formați tot prin punți de hidrogen. Atât monomerii, cât și oligomerii circulari prezintă în molecula lor dublu catenară unele creștături (*nicks*) monocatenare, care constituie locul de acțiune al DNA-ligazelor.

Moleculele CCI se detectează după formare prin rapida lor sedimentare (de 3,6—4 ori) în gradient de sucroză în mediu alcalin, față de moleculele liniare.

Lucrând cu DNA din bacteriofagul T7 ca substrat pentru testarea activității DNA-ligazei T4, Weiss și Richardson (1967) au obținut următoarele rezultate (fig. 29):

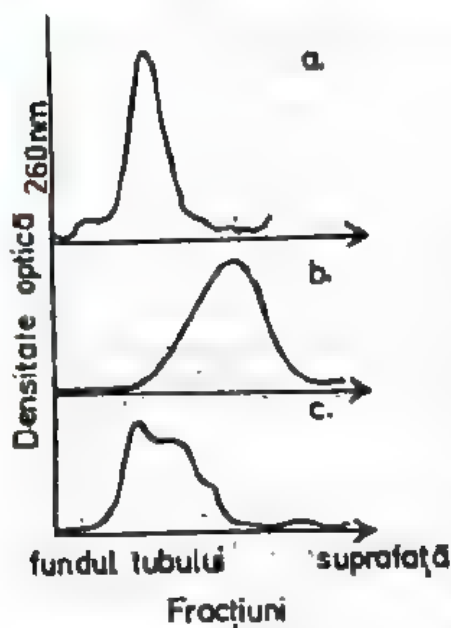


Fig. 29. Ultracentrifugarea analitică în gradient de sucroză și în mediu alcalin a produsilor reacției ligazice: a) DNA T7 martor; b) DNA T7 cu creștături realizate prin tratament cu DNază pancreatică, incubat cu ligază în absența ATP; c) DNA T7 cu creștături (vezi mai sus) incubat cu ligază în prezența ATP. Preparatele de DNA s-au denaturat anterior ultracentrifugării (după Weiss și Richardson, 1976).

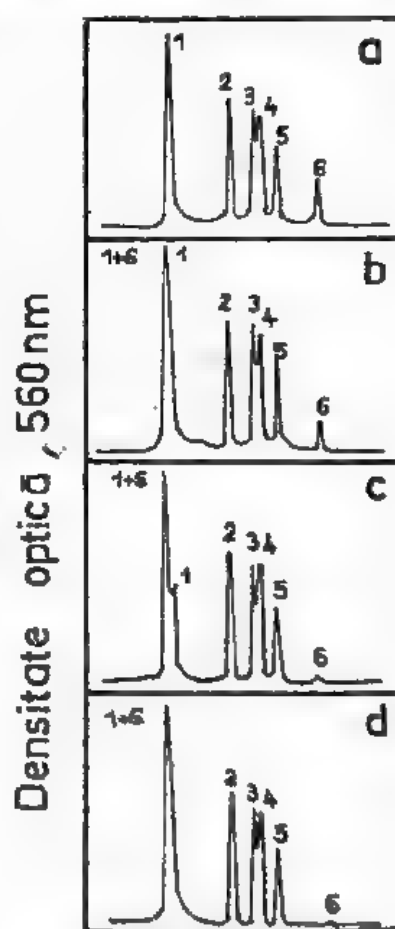
Se observă că DNA T7 intact (fig. 29, a) are o densitate mai mare decât cel cu creștături într-una din catene (fig. 29, b), mergând spre partea de jos a tubului. Prin acțiunea DNA-ligazei T4 o parte din materialul lezat se repară, el comportându-se la ultracentrifugare asemănător cu martorul (fig. 29, c).



**IV.5.1.2. Electroforeză.** Metoda folosește ca substrat pentru acțiunea ligazei DNA de bacteriofag  $\lambda$ , care a fost anterior supus hidrolizei cu endonucleaza de restricție *Eco RI*, rezultând șase fragmente cu următoarele mase moleculare:  $12 \times 10^6$  D (1),  $4 \times 10^6$  D (2),  $3,3 \times 10^6$  D (două fragmente identice) (3, 4),  $2,7 \times 10^6$  D (5),  $2,1 \times 10^6$  D (6). În momentul în care ligaza testată este pusă în contact cu aceste fragmente de DNA se constată dispariția de pe electroforegramă a benzii cu masa de  $2,1 \times 10^6$  D; are loc conversia benzilor 1 și 6, care se leagă inițial prin punți de hidrogen, la o formă *CCI*, nednaturabilă termic (fig. 30). Punerea în evidență a fragmentelor de DNA se face în UV, prin colorare cu bromură de etidiu.

**IV.5.1.3. Microscopie electronică.** Colorații specifice pot pune în evidență acizii nucleici. Pe preparate se pot deosebi formele *CCI* de cele

Fig. 30. Densitograma produșilor reacției ligazice, separați electroforetic. S-a înregistrat intensitatea fluorescenței benzilor de DNA colorat cu bromură de etidiu. Cantitatea de enzimă folosită a variat, crescând de la a) (o unitate) la d) (2 unități) (după Moore și James, 1976).



Migrare electroforetică

liniare. Moleculele rezultate prin circularizare intracatenară cu punți de hidrogen se aduc anterior colorării la conformația de DNA liniar. Metoda a fost pusă la punct de Sgaramella în 1972.

**IV.5.1.4. Ultrafiltrare.** Filtrele nitrocelulozice reușesc să facă discriminarea între diverse conformații ale DNA: liniar, circular cu punți de hidrogen — pe de o parte — și circular deschis (*CD*) și circular covalent

închis (*CCI*) — pe de altă parte. Primele forme enumerate trec prin filtre, în timp ce celelalte două sînt reținute. Drept substrat se utilizează, și în acest caz,  $^3\text{H}$ - sau  $^{32}\text{P}$ -DNA  $\lambda$  sau analog, după cum au preconizat Reiser și colab. (1976). Substratul, adus la forma sa liniară, se incubează cu probele de ligază, iar apoi reacția se stopează cu un detergent, de exemplu DDS. „Cercurile Hershey” (formate prin punți de hidrogen) sînt aduse la forma liniară. Se face apoi filtrarea. Formele *CD* și *CCI* rămîn pe filtru și se poate măsura radioactivitatea reținută, din care se apreciază gradul de legare.

IV.5.1.5. Enzimatic, cu exonuclează. Moleculele de tip *CCI*, formate prin legarea capetelor 3'-hidroxil și 5'-fosfat cu apariția legăturilor fosfodiesterice, devin insensibile la acțiunea exonucleazei III, după cum au constatat Olivera și Lehman (1967 a). Ca substrat, în acest caz, se pot folosi și polideoxiribonucleotide sintetice, de tipul copolimerului  $(\text{dA})_n \cdot (\text{dT})_n$  (cu cca 1000 nucleotide) propus de Modrich și Lehman (1970). Metoda prezintă o mare sensibilitate, aproximativ 1000 nucleotide devenind nesusceptibile la exonucleaza III ca urmare a sintezei unei singure legături fosfodiesterice.

Dintre aceste metode, metoda electroforezei și cea electronoptică permit aprecierea reacției ligazice mai ales din punct de vedere calitativ, pe cînd metoda ultracentrifugării, a ultrafiltrării și cea enzimatică permit și aprecieri cantitative asupra reacției ligazice, pe baza produselor marcate utilizate drept substrat.

## IV.5.2. Conversia DNA denaturat la forme renaturabile

Acest proces se pune în evidență prin adsorbție selectivă pe hidroxiapatită (Zimmerman și colab., 1967). În esență el constă în formarea de dimeri între un DNA liniar marcat și un DNA de bacteriofag  $\lambda$  care conține legături încrucișate (*cross links*) intercatenare, induse special în acest scop, cu ajutorul unor agenți alchilanți. După legarea lor cu ajutorul DNA-ligazei, DNA se denaturează cu alcalii, care desfac toate legăturile în afara celor covalente. Apoi *pH*-ul se corectează la neutru, iar DNA se adsoarbe pe hidroxiapatită, în condiții în care se adsorb numai formele native, nu și cele denaturate. Spre deosebire de DNA normal, nativ, cel care conține în molecula sa legături încrucișate se renaturează imediat după readucerea probei la *pH* neutru. Împreună cu el rămîne și catena de DNA liniar atașată sub acțiunea DNA-ligazei, iar cealaltă catenă nu se adsoarbe. Măsurarea activității reținute pe coloana de hidroxiapatită permite evaluarea reacției ligazice, iar DNA cu legături încrucișate constituie un purtător pentru oricare

DNA marcat ce i s-a alipit ca urmare a activității ligazice. Schematic, procesul de legare a unui DNA de DNA cu legături încrucișate se poate rezuma ca în fig. 31 (Gellert, 1971).

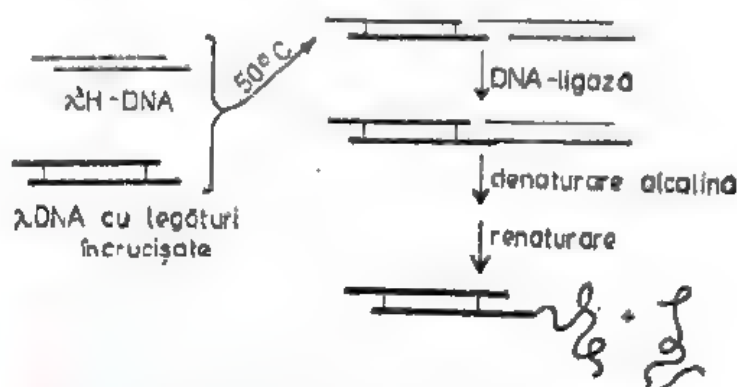


Fig. 31. Formarea dimerilor (și a unor agregate mai mari) prin legături de hidrogen între  $^3\text{H-DNA}$  de bacteriofag  $\lambda$  și DNA  $\lambda$  cu legături încrucișate intramoleculare (după Gellert, 1971).

#### IV.5.3. Conversia capetelor $5' - ^{32}\text{P}$ -fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați

Ca urmare a acestei conversii rezultă o serie întreagă de efecte, printre care:

**IV.5.3.1. Pierderea susceptibilității la fosfataza alcalină de origine bacteriană.** O serie de autori ca Weiss și Richardson (1967), Olivera și Lehman (1967 a), Geffer și colab. (1967) au arătat că activitatea ligazică poate fi determinată și prin testul susceptibilității DNA la fosfataza alcalină.

Testul are la bază următorul principiu: fosfataza alcalină hidrolizează grupările fosfat situate la capetele  $5'$ -fosfat ale DNA. Or, în situația în care grupările  $5'$ -fosfat terminale au dispărut prin interacțiunea lor cu grupările terminale  $3'$ -hidroxil (v. mecanismul de acțiune al ligazei), tocmai datorită acțiunii ligazei, susceptibilitatea DNA la fosfataza alcalină dispare (fig. 32).

În prima etapă, substratul marcat se scindează (fig. 32, a) cu ajutorul DN-azei I, obținându-se în molecula bicatenară creștături având capete  $3'$ -hidroxil și  $5'$ -fosfat adiacente (fig. 32, b). La rândul lor, aceste molecule constituie substrat pentru exercitarea acțiunii ligazice. În prezența enzimei de legare se reformează molecula inițială, reparată (fig. 32, c), asupra căreia fosfataza alcalină nu poate acționa, întrucât nu are capete fosfat libere. Dimpotrivă, dacă fosfataza este pusă în contact cu componenta b) din fig. 32, ea își va exercita acțiunea de scindare a grupărilor fosforice. În acest caz însă, ligaza nu va mai putea



intervenii în repararea creștăturilor, decât după ce capetele 5'-hidroxil generate de fosfatază (fig. 32, d) vor fi readuse la forma 5'-fosfat, cu ajutorul polinucleotidkinazei.

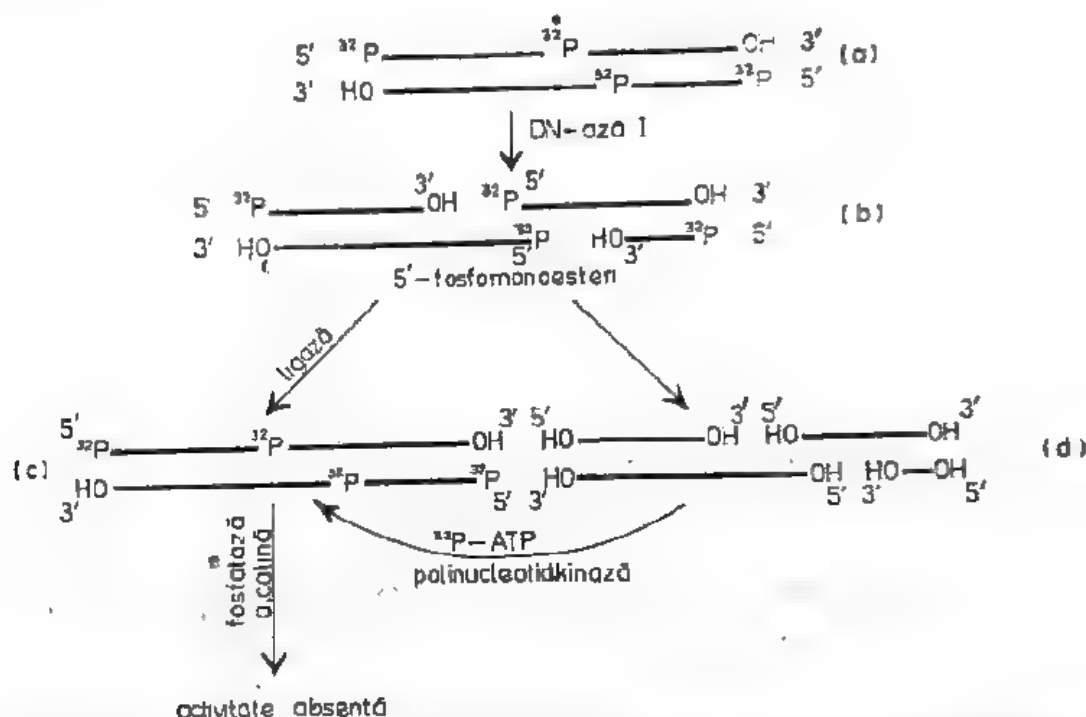


Fig. 32. Schema obținerii prin reacție ligazică a produșilor nesusceptibili (c) la acțiunea fosfatazei alcaline.

Olivera (1971), folosind ca substrat pentru testarea acțiunii ligazei în reacția de conversie un DNA bicatenar sintetic de tip poli (dA). poli (dT) constată că atât viteza reacției, cât și amploarea ei depind de lungimea relativă a celor două catene. Astfel, valorile maxime se ating cu un poli(dA) lung (1000 nucleotide cel puțin) și fragmente relativ scurte de poli(dT) (50-200 nucleotide). Proportia celor doi homopolimeri în duplex trebuie să fie întotdeauna 1 : 1. Scăderea lungimii lanțului poli(dA) sau modificarea raportului dA : dT provoacă întotdeauna o scădere marcată a legării. Reacția nu poate fi folosită pentru testarea acțiunii ligazice dacă se produce inversarea rolurilor: poli(dA) având catene scurte și poli(dT) având catena lungă, deoarece în acest caz se formează structuri tricatene, favorizate cinetic de lanțurile mici de poli(dA). Dacă fie dA, fie dT se înlocuiesc cu ribohomopolimerii corespunzători nu se observă activitate de legare.

**IV.5.3.2. Creșterea masei moleculare a lanțurilor polinucleotidice care au participat la reacția ligazică (modificarea coeficientului lor de sedimentare).** Olivera și Lehman (1971) au observat, lucrând cu polinucleotide sintetice, că lanțurile de poli (dT) scurte la început (cca 150 nucleotide) cresc ca lungime ca rezultat al acțiunii enzimei. Ultracen-

trifugarea în gradient de sucroză în mediu alcalin a arătat că 65% din lanțurile de poli(dT) ating un coeficient de sedimentare de cel puțin două ori mai mare decât poli(dT) reacționate, iar 5% din produsul de reacție sedimentează chiar de 20 de ori mai rapid decât substratul inițial (Weiss și Richardson, 1967).

IV.5.3.3. Scăderea numărului de capete 5'-fosfat ale substratului, apreciat prin calcularea diferenței între numărul lor la începutul reacției ligazice și numărul lor la terminarea reacției. Metoda a fost propusă de către Weiss și Richardson (1967) și a fost reluată de Sladkova (1976), care utilizează ca substrat tot DNA de bacteriofag T7, dar care calculează de fapt numărul leziunilor reparate, cu capete 5'-fosfat incluse în legături fosfodiesterice și nu capetele 5'-fosfat rămase libere.

IV.5.3.4. Alte metode. În afara metodelor de testare a activității DNA ligazice (de reparare a leziunilor cu capete 3'-hidroxil și 5'-fosfat adiacente dintr-o singură catenă a DNA bicatenar) prezentate, în literatura de specialitate se mai întâlnesc numeroase altele, cum ar fi:

- legarea unei catene polinucleotidice la o altă catenă polinucleotidică imobilizată pe o matrice solidă, de exemplu prin esterificarea capătului ei 5'-fosfat cu o grupare hidroxil a unui rest de glucoză din celuloză (Spadari și colab., 1971);

- folosirea ca substrat a acidului polideoxicitidilic marcat cu  $^{125}\text{I}$ ; sensibilitatea crescută a metodei (de 1000 de ori mai mare) permite scăderea limitei de determinare a activității ligazice sub cea a metodelor curente (Spadari, 1972);

- reducerea numărului situsurilor accesibile unei DNA polimeraze (Karkas, 1974);

- restabilirea activității de transformare a DNA lezat (Ando și Kosawa, 1970; Laipis, 1969) etc.

Majoritatea metodelor sînt, în general, deosebit de laborioase și implică și folosirea altor enzime, cu un înalt grad de puritate, precum și a unor substraturi greu de preparat și care trebuie să aibă o activitate specifică a izotopului cu care sînt marcate suficient de ridicată. De aceea, dacă este nevoie doar de a se obține o dovadă calitativă a activității ligazice, cea mai accesibilă este metoda electroforetică: reacția de legare are loc în condiții standard pentru enzimă, iar produsul rezultat este analizat pe gel de agaroză și pus în evidență în UV, după colorare cu bromură de etidiu.

#### IV.5.4. Rolul *in vivo* al DNA-ligazelor

Majoritatea cunoștințelor asupra funcției *in vivo* a DNA-ligazelor se datorează studiului unor mutante bacteriene în care enzima este defectivă. Întrucît etapa de legare a unor fragmente de DNA este pre-

zentă în toate modelele de recombinare genetică, în repararea leziunilor moleculare la nivelul DNA, precum și în replicarea DNA, se poate presupune că lipsa ligazei din anumite bacterii va produce o serie de aberații în oricare din aceste procese, ceea ce va înlesni studierea rolu-

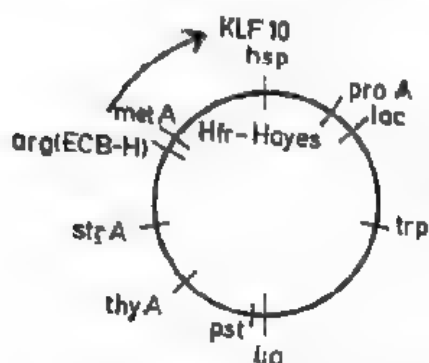


Fig. 33. Localizarea genei structurale pentru DNA-ligază pe harta genetică a *E. coli* (după Taylor și Trotter, 1967).

lui enzimei. S-au descris numeroși mutanți defectivi, atât în ceea ce privește *E. coli* DNA-ligaza, cât și DNA-ligaza T4.

Se cunosc două mutații ale genei structurale pentru ligază, iar ambele sînt situate pe harta genetică a *E. coli* la aproximativ 45 minute (Gottesman și colab., 1973; Taylor și Trotter, 1967) (fig. 33).

Deși extractele celulare ale ambilor mutanți conțin enzime anormale, termosensibile, numai unul dintre mutanți și anume *E. coli ligts7* (Gottesman și colab., 1973) este un mutant condițional letal, care nu supraviețuiește la 42°C, în timp ce mutantul celălalt *lig4* se comportă diferit. Ambii mutanți cultivă normal la 30°C. Diferența între comportările lor s-ar putea datora unei proporții diferite de activitate ligazică reziduală, care să persiste la temperatură ridicată.

Este interesant de văzut care sînt consecințele fiziologice ale acestor mutații. Mutantul *ligts7*, după cum s-a arătat mai sus, nu poate cultiva la 42°C și își pierde viabilitatea atunci cînd este trecut de la temperatura permisivă de 25°C la o temperatură nepermisivă (42°C). Același mutant s-a dovedit a fi deosebit de sensibil la agenții de alchilare, cum ar fi metilmetansulfonatul, sau la acțiunea razelor UV, chiar la temperatura permisivă. Bacteria care a suferit această mutație devine incapabilă să-și repare leziunile provocate la nivelul DNA de către agenții alchilanți mutageni.

Tulpina *ligts7*, după cum se poate presupune, prezintă defecte și la nivelul replicării DNA; lipsa ligazei duce la acumulări mari de fragmente Okazaki (Okazaki și colab., 1968), cu mult peste cele găsite la tulpina sălbatică. Întreaga cantitate de <sup>3</sup>H-timidină care se încorporează de către *E. coli ligts7* în cursul unei marcări de scurtă durată (10 secunde) la 42°C se regăsește într-o fracțiune de DNA cu coeficientul de sedimentare 10S. În condiții de creștere similare, tulpina *E. coli lig+* încorporează <sup>3</sup>H-timidina într-un DNA cu coeficient de sedimentare de 24S sau chiar puțin mai mare. Dacă marcarea de scurtă durată (în puls) a *E. coli ligts7* la 42°C este urmată de un tratament de 5 mi-



nute, la 25°C cu un exces de timidină nemarcată, cea mai mare parte a timidinei tritiate încorporate apare într-un DNA cu un coeficient mediu de sedimentare de 30S, ceea ce sugerează că materialul de 10S care se acumulează în mutant la temperatura nepermisivă este un precursor al DNA înalt polimerizat.

Întrucît existența unei DNA-ligaze funcționale este esențială pentru replicarea normală a DNA, precum și pentru repararea unor leziuni care pot apare la nivelul DNA, se pune întrebarea cum se poate explica creșterea normală, cît și viabilitatea mutantului *lig4* la temperaturi la care în extractele brute se găsește doar 1%, sau sub această valoare, activitate ligazică? S-ar putea ca ligaza să fie prezentă în celulă într-o cantitate mult mai mare decît cea de care celula are nevoie în mod normal.

Pe baza masei moleculare de 74 000 a enzimei *E. coli* DNA-ligază s-a făcut estimarea numărului de molecule de DNA ligază per celulă bacteriană, comparîndu-se activitatea enzimei pure cu activitatea determinată în extractele bacteriene brute. S-a constatat astfel că celulele de *E. coli* tulpină sălbatică crescute pe medii îmbogățite, ajung să conțină 200—400 replici de enzimă per celulă, număr apropiat de cel calculat pentru DNA-polimeraza I (Richardson și colab., 1964). Întrucît, la fel ca și DNA-polimeraza, DNA-ligaza acționează în ultima etapă a multiplicării DNA (Okazaki și colab., 1972), s-ar putea ca această asemănare frapantă între concentrațiile celor două enzime să nu fie întîmplătoare, ci să aibă o anumită semnificație legată de replicarea DNA.

Așa după cum s-a arătat anterior, o celulă de *E. coli* conține aproximativ 300 molecule de DNA-ligază (Modrich și colab., 1973). Întrucît turnover-ul enzimei este de  $25 \text{ min}^{-1}$  la 30°C (Modrich și Lehman, 1973), rezultă că în fiecare minut, într-o celulă pot fi reparate pînă la 7500 de creștături monocatenare ale moleculei de DNA. Deoarece ambele catene ale DNA cromozomal se replică în mod discontinuu (Gottesman și colab., 1973), iar DNA cromozomal de *E. coli* — la 30°C — se replică în aproximativ 65 minute (Bird și Lark, 1970), ținînd cont că lungimea medie a unui fragment Okazaki este de aproximativ 1000 nucleotide (Okazaki și colab., 1972), ar fi de ajuns ca într-o celulă, per minut, să aibă loc 200 de legări pentru ca multiplicarea celulelor să se poată produce.

### Bibliografie

1. Ando, T., Kosawa, T., *Biochim. Biophys. Acta* 204, 257 (1970).
2. Bird, R.E., Lark, K.G., *J. Mol. Biol.* 49, 343 (1970).
3. Bode, V.C., Kaiser, A.D., *J. Mol. Biol.* 14, 148 (1965).
4. Cozzarelli, N.R., Melechen, N.E., Jovin, T.M., Kornberg, A., *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 28, 578 (1967).
5. Fareed, G.C., Wilt, E.M., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.* 246, 925 (1971).
6. Gelfer, M.L., Becker, A., Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 58, 240 (1967).

7. Gellert, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **57**, 148 (1967).
8. Gellert, M., in „*Methods in enzymology*“, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 326 (1971).
9. Gottesman, M.M., Hicks, M., Gellert, M., *J. Mol. Biol.* **77**, 531 (1973).
10. Gumpert, R.I., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **68**, 2559 (1971).
11. Gupta, N.N., Ohtsuka, E., Weber, H., Chang, S.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **60**, 285 (1968).
12. Hall, Z.W., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.* **244**, 43 (1969).
13. Harvey, C.L., Gabriel, T.F., Wilt, E.M., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.* **246**, 4523 (1971).
14. Howell, S.H., Stern, H., *J. Mol. Biol.* **55**, 357 (1971).
15. Jackson, D.A., Symonds, R., Berg, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **69**, 2904 (1972).
16. Karkas, J.D., *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 452 (1974).
17. Kellenberg, G.M., Zichichi, M.L., Weigle, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **47**, 869 (1961).
18. Kleppe, K., van de Sande, J.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **67**, 68 (1970).
19. Laipis, P.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **62**, 269 (1969).
20. Lehman, I.R., *Science* **186**, 790 (1974).
21. Lehman, I.R., in „*The enzymes*“, ed. P. Boyer, Acad. Press (New York), vol. X, p. 237 (1974).
22. Lindhal, T., in „*Methods in enzymology*“, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 333 (1971).
23. Lindhal, T., Edelman, G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **61**, 680 (1968).
24. Lobban, P., Kaiser, A.D., *J. Mol. Biol.*, **78**, 453 (1973).
25. London, J., Knight, M., *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 241 (1966).
26. Meselson, M., Weigle, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **47**, 857 (1961).
27. Mizutani, S., Temin, H., Nasahiko K., Robert W., *Nature New Biol.*, **230**, 232 (1971).
28. Modrich, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **245**, 3626 (1970).
29. Modrich, P., Lehman, I.R., *Fed. Proc.*, **31**, 441 (1972).
30. Modrich, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7502 (1973).
31. Modrich, P., Anraku, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7495 (1973).
32. Modrich, P., Lehman, I.R., Wang, J.C., *J. Biol. Chem.*, **247**, 6370 (1972).
33. Moore, S.K., James, E., *Analyt. Biochem.*, **75**, 545 (1976).
34. Olivera, B.M., in „*Methods in enzymology*“, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 311 (1971).
35. Olivera, B.M., Hall, Z.W., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **61**, 237 (1968).
36. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1462 (1967a).
37. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1700 (1967b).
38. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 261 (1968).
39. Olivera, B.M., Scheffer, D., Lehman, I.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 275 (1968).
40. Okazaki, R., Arisawa, M., Sugino, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 2954 (1972).
41. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Sugino, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **59**, 598 (1968).
42. Panasencko, S.M., Alazard, R.D., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **253**, 4590 (1978).
43. Panasencko, S.M., Cameron, J.R., Davies, R.W., Lehman, I.R., *Science*, **196**, 188 (1977).
44. Panet, A., van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana, G.H., Raae A.J., Lillehaug J.R., Kleppe K., *Biochemistry*, **12**, 5045 (1973).
45. Reiser, J., Bentley, C.M., Yuan, R., *Analyt. Biochem.*, **75**, 555 (1976).
46. Richardson, C.C., Schildkraut, C.L., Aposhian H.V., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, **239**, 222 (1964).
47. Sgaramella, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3389 (1972).

48. Sgaramella, V., Bursztyn-Pettergrew, H., Ehrlich, D.S., in „*Recombinant molecules: impact on science and society*“, 10-th Miles Internat. Symp., ed. R.F. Beers & E.G. Basset, Raven Press (New York), p. 57 (1977).
49. Sgaramella, V., Ehrlich, S.D., *Eur. J. Biochem.*, **86**, 531 (1978).
50. Sgaramella, V., van de Sande, J.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **67**, 1468 (1970).
51. Silber, R., Malathi, V.G., Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3009 (1972).
52. Sladkova, N.I., *Bioorg. Himia*, **2**, 822 (1976).
53. Spadari, S., *Analyt. Biochem.*, **63**, 380 (1972).
54. Spadari, S., Ciarrochi, G., Falaschi, A., *Eur. J. Biochem.*, **22**, 1. (1971).
55. Taylor, A.L., Trotter, C.D., *Bacteriol. Rev.*, **31**, 332 (1967).
56. Tsukada, K., Ichimura, M., *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **42**, 1156 (1971).
57. Young, E.T., Sinsheimer, R.L., *J. Mol. Biol.*, **10**, 562 (1964).
58. Wang, J.C., *J. Mol. Biol.*, **55**, 523 (1971).
59. Weiss, B., in „*Methods in enzymology*“, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 319 (1971).
60. Weiss B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4543 (1968).
61. Weiss, B., Richardson, C.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1021 (1967).
62. Weiss, B., Thompson, A., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4556 (1968).
63. Zimmerman, S.B., Little, J.W., Oshinsky C.K., Gellert, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **37**, 1841 (1967).
64. Zimmerman, S.B., Oshinsky, C.K., *J. Biol. Chem.*, **244**, 4689 (1969).



## V. Vehicule (vectori)

Așa cum s-a arătat un *vehicul* sau un *vector* este o moleculă de DNA care are proprietatea de a se replica independent de cromozomul celular, proprietate pe care și-o păstrează și atunci când în moleculă sa se introduce în mod artificial un fragment de DNA străin (v. cap. „Pasagerii”), purtător al unei informații genetice noi. Este de notat că inserția fragmentului de DNA în vehicul trebuie astfel realizată încât funcțiile esențiale ale vehiculului, necesare replicării lui, să nu fie deranjate.

Pentru a se putea replica, un vehicul are nevoie de două elemente principale și anume: a) o regiune din moleculă de DNA, echivalentă originii replicării DNA (notată prescurtat *ori*) care să fie recunoscută de către o proteină cu funcție de inițiator și b) să conțină gena pentru această proteină în aceeași moleculă (Boyer și colab., 1977). Aceiași autori definesc astfel caracteristicile principale ale unui vehicul ideal:

- să fie ușor de purificat și să existe în cantități suficiente pentru experimentare;

- să posede markeri genetici asociați moleculei lor, bine caracterizați, care să permită o ușoară selecționare a celulelor purtătoare a acestor vehicule;

- să posede un număr limitat de situsuri pentru enzimele de restricție, care să ofere posibilitatea scindării specifice a vehiculului, în scopul atașării de el a unor fragmente noi de DNA.

Odată ce un vehicul posedă cele două elemente principale arătate mai sus, el îndeplinește condițiile postulate de Jacob și colab. (1963) pentru un *replicon*, deci el se poate autoreplica. Funcția de vehicul sau de replicon o pot ocupa atât plasmidele bacteriene, cât și unele virusuri. În principiu, orice plasmidă sau, cum precizează Nathans (1977), orice acid nucleic viral care este infectant poate fi folosit ca vehicul. Totuși, în practică s-au introdus numai anumite plasmide și acizi nucleici virali, cum sînt plasmidele colicinogene (*Col E<sub>1</sub>*), colifagul  $\lambda$  și virusul SV40. Preferința pentru aceste vehicule a fost dictată de cunoașterea detaliată

a mapei lor fizice, fapt care facilitează folosirea lor pentru construirea de molecule de recombinanți.

Plasmidele și colifagul  $\lambda$  au marele avantaj de a se replica în celulele bacteriene, care — așa cum se cunoaște — au o rată rapidă de multiplicare. De aici rezultă posibilitatea multiplicării avantajoase a vehiculului, purtător al informației genetice noi, fapt esențial pentru producerea pe scară industrială a unui anumit produs biologic codificat de pasager. Aceasta deoarece pasagerul introdus în vehicul — indiferent de natura lui — ajunge sub controlul vehiculului care îl replică și îl exprimă ca o parte integrantă a moleculei sale. Rezultă că o plasmidă bacteriană, de exemplu, poate să multiplice și să exprime gena pentru insulină într-o cultură bacteriană, dacă în plasmida respectivă a fost introdusă gena insulinei. Acesta este principiul pe care se bazează obținerea unor produși biologic activi importanți prin tehnologia DNA recombinant.

Referitor la virusul SV40, precizăm că acidul său nucleic are proprietatea de a se integra în DNA celular. În consecință, el va putea fi folosit în viitorul apropiat ca vehicul pentru inserția de gene în cromozomul celulelor de mamifere (Nathans, 1977). Ca atare, el ar putea deveni un agent eficient pentru tratamentul unor maladii care au la bază tulburări metabolice datorate unor defecte genetice; atașarea de acest vehicul (lipsit însă de zona moleculară care induce transformarea celulară!) a genelor deficiente din genomul organismului bolnavilor respectivi și integrarea lui în genom ar putea deschide calea terapiei genice.

S-a amintit mai sus că DNA din virusul SV40 are o parte din molecula sa responsabilă de transformarea celulară și că această parte trebuie modificată în moleculă în momentul în care se pune problema utilizării lui ca vehicul pentru inserția de gene în genomul celular. S-a ajuns astfel la o situație mai generală și anume la pregătirea sau construcția vehiculului ideal pentru cercetările de tehnologie cu DNA recombinant.

Construcția unui vehicul ideal trebuie să țină cont de două condiții esențiale și anume: a) să se elimine din vehicul toate părțile neesențiale sau generatoare de efecte nedorite, astfel încât proprietățile sale de replicare să nu fie afectate și b) replicarea lui să fie dependentă de anumite condiții experimentale de creștere a celulelor în care se replică. Dacă prima condiție are justificarea menționată, a doua necesită unele precizări. După cum se știe, construcția unui vehicul se face în scopul multiplicării unei anumite informații genetice pe care în mod natural plasmida sau virusul nu o posedă inițial. Cum un vehicul poate multiplica orice fragment de DNA străin atașat de el, aceasta înseamnă că și inserția — chiar întâmplătoare — în vehicul a unei informații genetice nedorite să fie urmată atât de multiplicarea, cât și de diseminarea ei. Or, pentru a avea vehiculul sub controlul cercetătorului, el este astfel construit ca multiplicarea lui să se facă numai în condiții speciale de laborator.

Este deci vorba aici de o măsură de securitate pentru a împiedica bio-hazardul.

În continuare vor fi descrise caracteristicile principale ale vehiculelor utilizate în tehnologia DNA recombinant.

## V.1. Elemente extracromozomale. Plasmide bacteriene

În anul 1959, Ochiai și Akibe — în mod independent unul de altul — au raportat, în Japonia, un fenomen necunoscut pînă atunci și anume rezistența multiplă a bacteriilor enterice la medicamente (antibiotice), proprietate care poate fi transferată *in vitro* la bacterii susceptibile la medicamente. Investigarea acestui fenomen a pus în evidență existența în unele bacterii a unor *factori transmisibili de rezistență la medicamente* sau pe scurt *factori R* (Watanabe, 1963). Ulterior atît factorii *R*, cît și factorii de sex *F*, precum și alte componente bacteriene care nu sînt sub controlul genetic al cromozomilor au primit denumirea generală de *plasmide* sau *elemente extracromozomale*. Caracteristica esențială și comună a tuturor plasmidelor este capacitatea lor de propagare proprie, ca atare sau împreună cu oricare genă legată de ele. Clowes (1972) definește astfel o plasmidă: „un element care este separat fizic de cromozomul celular și este capabil de a se perpetua stabil în această stare”. Termenul de element extracromozomal este sinonim cu acela de plasmidă. El poate fi definit și ca un element neesențial pentru creșterea celulelor normale, putînd fi pierdut sau cîștigat de celule fără efect letal. Acele plasmide care au proprietatea de a ocupa un loc în cromozom se numesc *epizomi*. În timp ce o plasmidă poate sau nu poate fi un epizom, toți epizomii sînt plasmide. Întrucît definiția de epizom implică o relație genetică între plasmidă și celulele-gazdă, același element poate fi un epizom într-o celulă-gazdă și plasmidă într-o altă celulă.

Este important de precizat că cele mai multe gene ale plasmidelor par să nu aibă echivalenți cromozomali, de unde rezultă necesitatea evidentă de a face deosebirea între genele plasmidelor și ale cromozomilor, care uneori pot fi similare fenotipic, dar sînt total distincte din punct de vedere funcțional.

### V.1.1. Clasificarea plasmidelor

Pe baza proprietăților biologice pe care le prezintă, Cohen (1976) împarte plasmidele în nouă categorii, cu următoarele caracteristici:

- 1) prezintă abilitatea de a transfera material genetic prin conjugare ..... *F*, *R*<sub>1</sub>, *Col*<sub>1</sub>



- 2) produc bacteriocine ..... ColDF 13 (*Enterobacterium cloacae*), Col<sub>1</sub>
- 3) produc antibiotice, ..... SPC1 (plasmida din *Str. coelicolor*)
- 4) produc rezistență la metale grele (Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>) ..... pI258 (*S. aureus*), R<sub>6</sub>
- 5) produc rezistență la ultraviolete ..... Col Ib, R<sub>46</sub>
- 6) produc enterotoxine ..... Enterobacteriaceae
- 7) determină factorul de virulență (antigen hemolizina K<sub>88</sub>) ..... Col V, Hly
- 8) produc tumorigenicitate la plante ..... plasmida T1 (*Agrobacterium tumefaciens*)
- 9) determină restricție și modificare ..... producția de nuclează Eco RI și metilază (plasmida din *E. coli* RY13)

În ciuda diversității lor, s-au făcut unele generalizări privind clasificarea plasmidelor. Astfel, plasmidele au fost grupate în două tipuri majore: conjugative și neconjugative.

**V.1.1.1. Plasmide conjugative.** Se spune că o plasmidă este conjugativă sau este clasificată ca factor de sex dacă este autotransmisibilă de la o celulă bacteriană la alta (*conjugare*). Prezența plasmidelor de acest tip conferă proprietatea de donor celulelor care le posedă. Aceste celule donatoare sînt capabile să transfere plasmide sau alte informații genetice celulelor receptoare.

În general, plasmidele conjugative au masa moleculară mare, de aproximativ  $40-70 \times 10^6$  daltoni, dar mărimea lor este de obicei cuprinsă în domeniul  $17-200 \times 10^6$  daltoni.

Plasmidele conjugative se împart, la rîndul lor, în două categorii: *represate* și *derepresate*, pentru fertilitate. S-a stabilit că marea majoritate a plasmidelor existente în natură sînt represate, ceea ce înseamnă că acestea permit celulelor să transfere plasmida în proporție de numai 0,01%—1% din timp, în condițiile optime de laborator. În schimb, plasmidele derepresate permit tuturor celulelor donatoare să transfere plasmida.

**V.1.1.2. Plasmide neconjugative.** Aceste plasmide nu au capacitatea de a promova conjugarea. Dimensiunea lor este mică, cuprinsă între  $0,5-15 \times 10^6$  daltoni. Se găsesc în copii multiple per celulă. Dacă o plasmidă conjugativă este corezidentă cu o plasmidă neconjugativă, plasmida mai mică (deci cea neconjugativă) poate fi transferată (mobilizată) la o celulă receptoare în timpul conjugării.

Este important de reținut că numai plasmidele neconjugative pot fi întrebuințate pentru introducerea DNA străin în *E. coli* K12. Dintre

plasmidele care au primit avizul pentru a fi folosite ca vehicule în celulele-gazdă *EK1* sau *EK2* ( $\chi$  1776) amintim plasmidele *pMB9*, *pBR313*, *pBR322* și *pSC101* (v. pag. 130). Aceste plasmide au caracteristica comună de a fi transferate (mobilizate) cu o frecvență foarte scăzută în condiții nepermissive de laborator, ceea ce conferă un grad crescut de protecție biologică pentru experimentele de tehnologie a DNA recombinant.

### V.1.2. Compoziția fizică a plasmidelor

În 1961 Marmur și colab. aduc prima dovadă directă a naturii fizice a plasmidelor bacteriene. Autorii au transferat activitatea de fermentare a lactozei asociată cu factorul  $F'$  ( $F' lac^+$ ) de la o tulpină de *E. coli* la o tulpină de *Serratia marcescens* și au analizat DNA al tulpinii acceptoare. Ultracentrifugarea analitică în gradient de densitate de CsCl a arătat prezența unui vîrf de DNA caracteristic cromozomului tulpinii *S. marcescens* ( $\rho = 1,718 \text{ g/cm}^3$ ) și, ceea ce a fost surprinzător, un umăr corespunzător DNA din *E. coli* ( $\rho = 1,709 \text{ g/cm}^3$ ). Trebuie precizat că umărul nu a fost observat niciodată în tulpina parentală de *S. marcescens*, înaintea transferului de factor  $F$ .

Ulterior, Falkow și colab. (1964) au transferat factorul  $F' lac^+$  la o tulpină de *Proteus*. Prezența factorului a fost urmărită, alături de alte teste, și prin analiza DNA izolat din *Proteus* înainte și după transfer, precum și după un tratament considerat clasic prin care factorul  $F'$

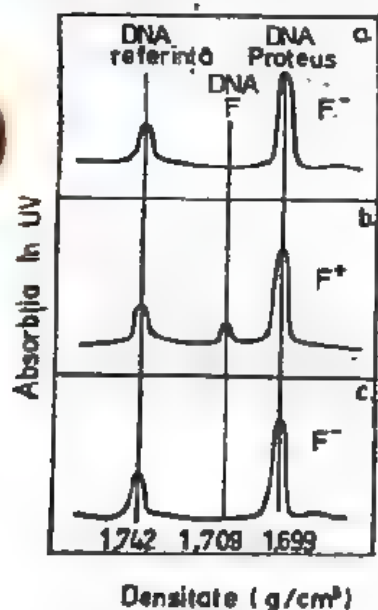


Fig. 34. Prezentarea grafică a profilelor de densitate a DNA din *Proteus* înainte (a) și după (b) transferul factorului  $F' lac^+$ , precum și a DNA din *Proteus* „vindecat” de factorul  $F'$  prin tratamentul cu acridinoranj (c). Pentru o bună identificare a benzilor de DNA, analiza a mai conținut și un DNA de referință cu o densitate mare ( $\rho = 1,742 \text{ g/cm}^3$ ) (după Falkow și colab., 1964).

a fost „vindecat” sau înlăturat cu ajutorul acridinoranjului. Figura 34 prezintă rezultatul analizei DNA: comportarea DNA din *Proteus* ( $\rho = 1,699 \text{ g/cm}^3$ ) în absența factorului  $F'$  și în prezența unui DNA de referință (DNA din *Bacillus subtilis* care are densitatea  $\rho = 1,742 \text{ g/cm}^3$ ) (fig. 34, a) și comportarea DNA din tulpina de *Proteus* căreia i s-a trans-

ferat factorul  $F'$  (fig. 34, b). Așa cum rezultă din figură, DNA conține un vîrf satelit separat, corespunzător factorului  $F'$ , la densitatea de 1,709 g/cm<sup>3</sup>. Este important de remarcat că vîrful satelit nu a mai fost prezent atunci cînd factorul  $F'$  a fost „vindecat” de către acridinoranj (fig. 34, c). Aceste cercetări au fundamentat ideea că factorul  $F'$  este constituit din DNA, idee care s-a generalizat apoi pentru toate plasmidele.

### V.1.3. Masele moleculare ale DNA plasmidic

Inițial, estimarea maselor moleculare ale DNA plasmidic s-a făcut pe preparate obținute prin metoda lui Marmur (1961). Condițiile oarecum drastice impuse de metodă, prin care se îndepărtează proteinele din DNA, determină însă fragmentarea moleculei de DNA în segmente cu masa moleculară de aproximativ  $10 \times 10^6$  daltoni. Odată cu introducerea unor metode mai blînde de extracție a DNA — cum a fost aceea preconizată de Hickson și colab. (1967) — s-a constatat că masele moleculare ale DNA plasmidic sînt uneori chiar mai mari decît  $100 \times 10^6$  daltoni. În esență, metoda aceasta constă în obținerea mai întîi a sferoplastelor, prin tratarea bacteriilor cu un amestec de lizozim, RN-ază și EDTA, în prezența sucrozei, urmată de tratamentul acestora cu un detergent de tipul DDS, pentru a produce liza celulară. În etapa finală a purificării, proteinele sînt îndepărtate prin tratamentul cu fenol tamponat, iar fenolul se elimină prin dializă.

Estimarea maselor moleculare ale DNA plasmidic se face, în principal, prin trei procedee: unul bazat pe constantele de sedimentare stabilite prin ultracentrifugare, al doilea pe determinările lungimii de contur a moleculei de DNA, efectuate cu microscopul electronic, iar al treilea prin determinarea mobilității electroforetice în gel de agaroză.

În primul caz, constantele de sedimentare se raportează la un DNA standard, care în cele mai multe cazuri este DNA din fagul  $\lambda$ , avînd masa moleculară de 30,8 Mdal (megadaltoni; 1 Mdal =  $10^6$  dal). În al doilea procedeu, masa moleculară se estimează din relația stabilită de Lang (1970) pentru DNA bicatenar, conform căreia 1 nm = 2,07 Mdal. În ceea ce privește al treilea procedeu, care în ultimul timp a devenit cel mai folosit, el permite determinarea masei moleculare relative în raport cu molecule standard, aflate în aceeași conformație.

Datele actuale permit a se preciza că plasmidele au dimensiuni variabile, între 2 250 de nucleotide (masă moleculară de aproximativ 1,3 Mdal), dimensiune descrisă pentru plasmida minicirculară „criptică” a bacteriei *E. coli* 15 (Cozzarelli și colab., 1968) și 400 000 de perechi de nucleotide (masă moleculară de aproximativ 240 Mdal), dimensiunea pe care o ating plasmidele mai complexe ale factorilor de sex  $F'$  (Cohen, 1976). Valoarea dată de Cohen pare însă a fi excesiv de mare, dacă



se țin cont de tabelele publicate de Clowes (1972) pentru masele moleculare ale factorilor de sex  $F'$  în care cifrele variază între 35 și 75 Mdal. În tabelul 13 sînt redată masele moleculare ale unor plasmide.

Tabelul 13

Masele moleculare ale unor plasmide

Plasmida	Masa moleculară (Mdal)	Referința
Factori de sex ( $F$ și $F'$ )	$F$ 42	Freifelder (1968)
	$F'$ -gal 48	Freifelder (1968)
	$F'$ -lac 69	Freifelder (1968)
Factori colicinogeni ( $Col$ )	$Col E_1$ 4,8	Roth și Helinski (1967)
	$Col E_2$ 6,0	Bazaral și Helinski (1968)
	$Col E_3$ 6,0	Bazaral și Helinski (1968)
	$FV Btct$ 113	Hickson și colab. (1968)
Factori de rezistență ( $R$ )	$R_{18}$ 46	Nisoka și colab. (1970)
	$222/R_4$ 70	Nisoka și colab. (1970)
	$222/R_{3w}$ 69	Nisoka și colab. (1970)
	$R_1$ 59	Cohen și Miller (1964)

Precizăm că tabelul nu conține masele moleculare ale plasmidelor special construite pentru cercetările de tehnologie a DNA recombinant.

#### V.1.4. Conformațiile moleculare ale DNA plasmidic

În mod oarecum surprinzător, conformațiile moleculelor de DNA plasmidic sînt asemănătoare celor pe care le prezintă virusurile oncogene DNA; polioma, papiloma și SV40.

În mediu neutru, o primă conformație moleculară descrisă pentru DNA plasmidic este aceea de moleculă bicatenară circulară covalent închisă (CCI) sau, în termenii consacrați în literatură *covalently closed circular duplex molecule* (CCC). Caracteristic pentru această conformație este faptul că atunci cînd este izolată din celulă ea își asumă o formă „superîncolăcită” (*supercoil*), adică elicea dublă a DNA se răsucește suplimentar în jurul ei însăși. La această moleculă ambele catene sînt continui, fiind închise covalent (v. fig. 35,c).

A doua conformație pe care o poate avea o moleculă de DNA plasmidic este aceea de „duplex circular deschis” (CD) (*open circular duplex*) (OC). În acest caz molecula este circulară, avînd o catenă continuă, iar a doua discontinuă. Datorită discontinuității uneia din catene ea se mai numește și „cerc crestat” (*nicked circle*). În această conformație molecula de DNA nu se mai superîncolăcește, motiv pentru care se numește și „relaxată” (fig. 35, b).

Prin scindarea (crestarea) catenei continui a moleculei de duplex circular deschis ea trece în cea de a treia conformație pe care o poate

avea molecula de DNA plasmidic și anume aceea de „duplex liniar” (fig. 35, a).

În mediu alcalin, când toate legăturile de hidrogen dintre baze se rup și catenele se desfac, moleculele CCI trec într-o conformație compactă, avînd coeficientul de sedimentare relativ (față de duplexul

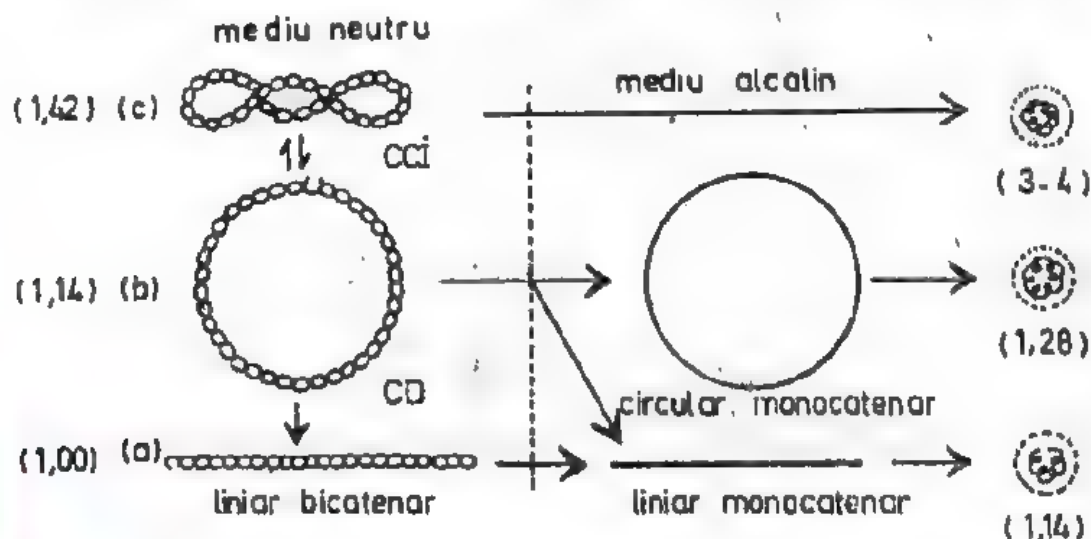


Fig. 35. Diferite conformații moleculare pe care le pot avea moleculele de DNA plasmidic sau DNA din virusurile oncogene SV40, polioma și papiloma în mediu neutru sau alcalin. În paranteză sînt prezentați coeficienții de sedimentare relativi raportați la cel al moleculei de DNA bicatenar (duplex) liniar luat ca referință.

liniar, considerat etalon) crescut de 3—4 ori. Cele două catene ale moleculelor CCI fiind întrepătrunse nu se separă. În același mediu, moleculele duplex circulare deschise se denaturează, iar cele două catene ale sale se despart, una dă naștere la un cerc monocationar cu catena continuă, avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,28, iar a doua devine moleculă monocationară liniară avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,14.

Sub influența alcaliilor, duplexul liniar se desface în cele două catene liniare avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,14.

Trecerile pe care le suferă conformațiile DNA plasmidic în mediu neutru și alcalin sînt reprezentate schematic în fig. 35.

Din examinarea fig. 35 rezultă clar că atunci când se supun ultracentrifugării moleculele de DNA plasmidic, conformațiile lor pot fi ușor recunoscute după coeficientul de sedimentare caracteristic pe care îl prezintă. Moleculele care sedimentează cel mai rapid sînt cele aflate în conformația CCI, urmează apoi în ordine cele în conformație de cerc deschis, iar ultimele sedimentează moleculele liniare.

Cele trei conformații pot fi identificate rapid prin metoda electroforezei în gel de agaroză: moleculele CCI au mobilitatea electroforetică cea mai mare, iar moleculele CD — mobilitatea cea mai mică, formele liniare avînd o mobilitate intermediară (fig. 36). Trecerea moleculelor





Fig. 36. Electroforeza moleculelor circulare covalent închise (CCI), circulare deschise (CD) și liniare ale plasmidelor *pBR313*, *pSF2124*, precum și a DNA din virusul SV40, puse în evidență prin electroforeză în gel de agaroză.

A) Coloana 1-a conține: DNA CCI (spotul de jos), DNA CD (spotul de sus) ale plasmidei *pBR313*. Coloana a 2-a conține: DNA CCI (spotul de jos) și DNA CD (spotul heterogen) ale plasmidei *pSF2124*. Coloana a 3-a conține DNA liniar al plasmidei *pBR313*, iar coloana a 4-a DNA liniar al plasmidei *pSF2124*. Formele liniare ale celor două plasmide s-au obținut prin încălzirea DNA CCI + CD (din materialul caracterizat în coloanele 1 și 2) cu enzima de restricție Eco RI. Precizăm că ambele plasmide conțin un situs pentru Eco RI.

B) Cele trei conformații moleculare ale DNA extras din virusul SV40. Coloana 1-a prezintă conformația CCI (spotul de jos) și conformația CD (spotul de sus). Coloana a 2-a arată conversia celor două conformații moleculare în conformația liniară de restricție Eco RI (după Popa și colab., 1981).



din conformația CCI (și CD) în cea liniară se face de obicei cu ajutorul enzimelor de restricție, cu condiția ca molecula de DNA în conformație CCI să aibă un singur situs pentru enzima respectivă.

### V.1.5. Calculul coeficienților de sedimentare a diferitelor conformații de DNA

Pentru moleculele de DNA aflate în aceeași conformație moleculară coeficienții de sedimentare (exprimați în unități Svedberg) se calculează din masele lor moleculare, cu ajutorul unor formule empirice, cum se va arăta în continuare.

Pentru moleculele de DNA aflate în conformație de duplex liniar coeficientul de sedimentare ( $S$ ) se deduce din formula:

$$S_{20,w}^0 = 2,8 + 0,00834 M^{0,47} \text{ (Freifelder, 1970)}$$

în care  $M$  este masa moleculară a DNA.

În cazul duplexului circular deschis formula devine:

$$S_{20,w}^0 = 2,7 + 0,0175 M^{0,445} \text{ (Hudson și colab. 1968)}$$

iar pentru duplexul circular covalent închis:

$$S_{20,w}^0 = 7,44 + 0,00243 M^{0,58} \text{ (Hudson și colab. 1968)}.$$

Calculând raportul coeficienților de sedimentare a DNA aflat în diferite forme conformaționale în funcție de masele lor moleculare, Freifelder (1970) a constatat că acesta variază după anumite curbe specifice (fig. 37).

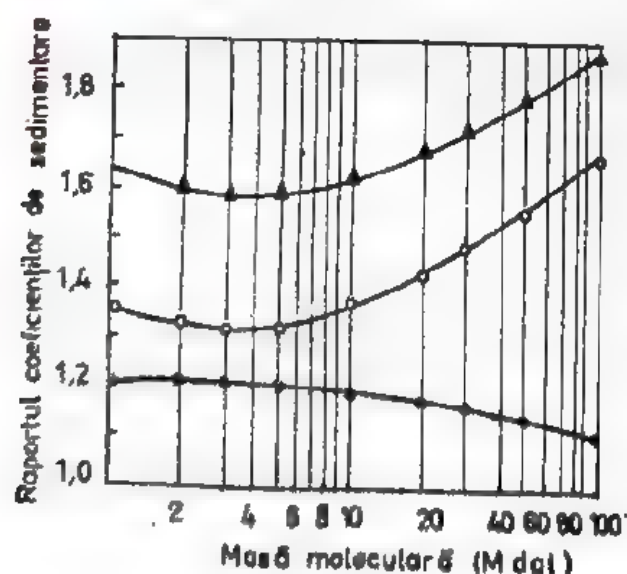


Fig. 37. Variația raportului coeficienților de sedimentare a moleculelor de DNA aflate în diferite conformații moleculare în funcție de masele lor moleculare (după Freifelder, 1970).

Valoarea absolută a coeficientului de sedimentare a unui DNA aflat în conformație de cerc deschis (CD) sau cerc covalent închis (CCI) poate fi determinată printr-o cosedimentare a DNA, respectiv cu un DNA standard, aplicându-se cunoscuta formulă:

$$S_1/S_2 = D_1/D_2$$

în care  $S_1$  și  $S_2$  sînt coeficienții de sedimentare, iar  $D_1$  și  $D_2$  distanțele pe care le parcurg în cîmpul centrifugal de la menisc DNA standard și DNA al cărui coeficient de sedimentare urmează să fie determinat.

Pentru exemplificare, în fig. 38 se prezintă aspectul general al unei analize de ultracentrifugare în care s-a cosedimentat un amestec de DNA

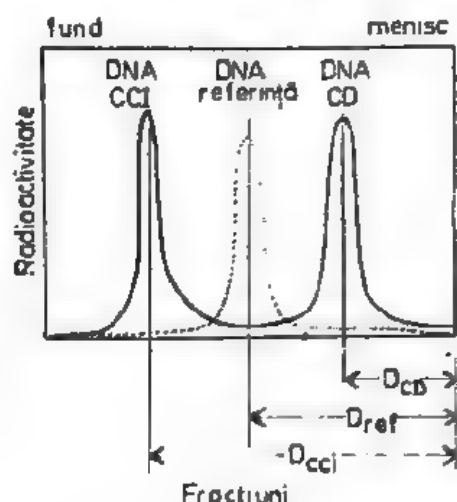


Fig. 38. Comportarea moleculelor CCI și CD în cursul ultracentrifugării (după Clowes, 1972).

conținînd molecule CCI și CD (avînd coeficienții de sedimentare necunoscuți) împreună cu un DNA standard.

Coeficientul de sedimentare al formei liniare a unui DNA ( $S_3$ ) se poate stabili aproximativ prin divizarea valorii lui  $S_1$  prin valoarea rezultată din raportul CD: liniar, corespunzătoare masei moleculare aproximative stabilite în fig. 38.

Calculul masei moleculare a unui DNA în conformația de duplex liniar se face după cum urmează.

Considerînd că  $S_2$  este coeficientul de sedimentare, iar  $M_2$  masa moleculară a unui DNA de referință, masa moleculară a unui DNA în formă liniară poate fi estimată din formula prezentată de Burgi și Hershey (1963):

$$\frac{S_2}{S_3} = \left( \frac{M_2}{M_1} \right)^{0,38}$$

în care  $S_3$  este coeficientul de sedimentare a DNA în formă liniară (stabilit prin aproximație după cum s-a arătat mai sus), iar  $M_2$  masa moleculară a DNA liniar.

Exponentul 0,38 este un număr empiric, stabilit pe baza determinării maselor moleculare ( $M$ ) a mai mulți DNA.

### V.1.6. Replicarea DNA plasmidic

De la început trebuie precizat că în momentul de față nu există un mecanism general valabil pentru replicarea tuturor tipurilor de plasmide. Mecanismele propuse se bazează pe observațiile experimentale

obținute pe anumite tipuri de plasmide. Ca atare, aceste modele trebuie luate în considerare specific numai pentru plasmidele respective, pînă cînd se vor aduna și alte date experimentale care să asigure generalizarea lor.

Cele mai multe modele de replicare a plasmidelor își au originea în primul model propus de Jacob și colab., 1963. Multe din aspectele acestui model au fost eliminate, dar ideile sale de bază rămîn încă valabile. Pentru moleculele de DNA circulare, capabile a se autoreplica (cazul plasmidelor), se presupune că există două situsuri care controlează replicarea lor. Un situs este reprezentat de gena reglatoare, care produce o substanță difuzabilă denumită „inițiator”. Aceasta acționează asupra celui de al doilea situs denumit „operatorul” replicării sau pe scurt „replicator”, care determină inițierea replicării din locul său.

Pentru a explica replicarea și moștenirea stabilă a proprietăților plasmidelor de tip *F*, de exemplu, s-a presupus că repliconul acestei plasmide se atașează de un loc al celulei de care se atașează și cromozomul. S-a sugerat că acest loc de atașare este situat pe membrana celulară, care controlează semnalul de inițiere a replicării atît pentru cromozom, cît și pentru plasmidă.

În timpul fiecărei generații celulare, locul de pe membrană împreună cu plasmidele atașate se duplică astfel încît la diviziunea celulară se produce o copie a locului de pe membrană împreună cu plasmida(ele) și cromozomul(mii) atașat la fiecare celulă-fiică. Astfel se asigură moștenirea stabilă a tuturor caracterelor celulare, controlate atît de plasmide, cît și de cromozomi (Clowes, 1972).

În ultimul timp, atenția cercetătorilor care studiază replicarea moleculelor circulare covalente închise (CCI) în diferite sisteme biologice s-a concentrat asupra a patru intermediari de replicare posibili, pe care îi prezentăm în fig. 39.

Mecanismele propuse pentru replicarea DNA circular au o caracteristică comună și anume scindarea cercului în timpul replicării cu sco-

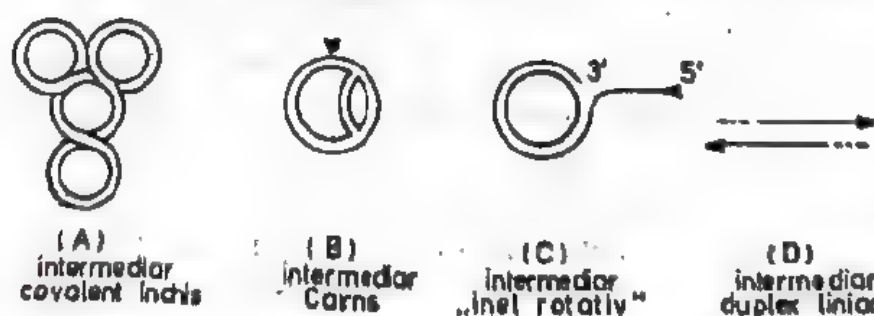


Fig. 39. Patru intermediari posibili care pot apare în cursul multiplicării DNA plasmidic.

pul de a permite separarea celor două catene parentale. Diferențele care există între mecanisme constau atît în natura scindării, cît și a primerului necesar pentru sinteza catenelor-fiice. În cazul intermediarului A din fig. 39, care este o moleculă circulară închisă, replicarea presupune



existența unor sciziuni și închideri periodice, alături de schimbarea răsucirii moleculei. Astfel de procese ale intermediarului de replicare au fost descrise pentru o serie de molecule de DNA circulare de tipul DNA al virusului SV40, polioma și DNA mitochondrial (Kasamatsu și Vinograd, 1974). Intermediarul *B* prezintă caracteristica „furcii” de replicare, sugerată de Cairns și posedă o sciziune permanentă. În plus, pentru replicare, el are nevoie de un primer (la fel ca și intermediarul *A*) care să inițieze sinteza DNA. Al treilea model de replicare, bazat pe intermediarul *C* de tipul „inelului rotativ”, implică existența unei sciziuni stabile pentru adăugarea deoxiribonucleotidelor noi la catenele parentale. În sfârșit, intermediarul *D* este o moleculă de DNA bicatenară liniară rezultată din scindarea DNA circular conform mecanismului descris anterior.

Majoritatea cercetătorilor angajați în studiul replicării și transferului plasmidelor preferă modelul de replicare bazat pe sistemul inelului rotativ. În acest model ipotetic se consideră că o proteină inițiator produce o sciziune în DNA plasmidic *CCI*, convertindu-l într-o formă circulară deschisă. Catena ruptă, astfel produsă, poate fi transferată începând cu capătul ei 5'-terminal. În schimb, celălalt capăt (3'-OH), rămâne fixat prin legături de hidrogen de catena intactă, circulară, a DNA și poate astfel iniția sinteza continuă a catenei de DNA care să o înlocuiască pe cea transferată. Acest mecanism permite transferul continuu al unei singure catene de DNA plasmidic celulelor recipiente, astfel ca cele mai multe dintre ele să primească DNA în exces față de lungimea DNA plasmidic monocatenar monomeric. Transferul unei lungimi mai mari de DNA este necesar pentru păstrarea informației genetice în timpul reformării stării bicatenare. Prin urmare, în forma sa cea mai simplă, modelul inelului rotativ necesită existența în celula donoare a unei proteine-inițiator cu activitate de sciziune, a unei DNA-polimeraze și a unei DNA-ligaze pentru a închide ruperea monocatenei după terminarea transferului.

În continuare se va prezenta un model de replicare și transfer al DNA aparținând plasmidelor de tip *R* și *F*, care permite transferul discontinuu și ciclic al DNA plasmidic monocatenar monomeric, posedând capacitatea de a se circulariza în celula recipientă după conversia în formă bicatenară.

Modelul a fost propus de Curtiss și Fenwick, în 1975. El presupune că DNA *CCI* poate fi convertit într-o formă bicatenară liniară cu capete coezive, iar replicarea și transferul DNA se produc pe această matrice. Capetele coezive conțin aproximativ 10–20 de nucleotide, dar pentru motive de simplificare se indică numai cinci perechi de nucleotide.

În fig. 40, *A* este reprezentat DNA plasmidic în stare de repaus, așa cum se găsește în citoplasmă. În momentul în care această moleculă ajunge în contact cu un receptor adecvat ea se asociază cu membrana interioară, iar ambele sale catene sînt scindate pentru a da naștere

la structura circulară deschisă arătată în fig. 40, B. Molecula aceasta poate să-și asume o conformație liniară bicatenară avînd capetele monocatenare (fig. 40, c). Datorită unei DNA-polimeraze, capetele monocatenare vor deveni și ele bicatenare, astfel că toată molecula se trans-

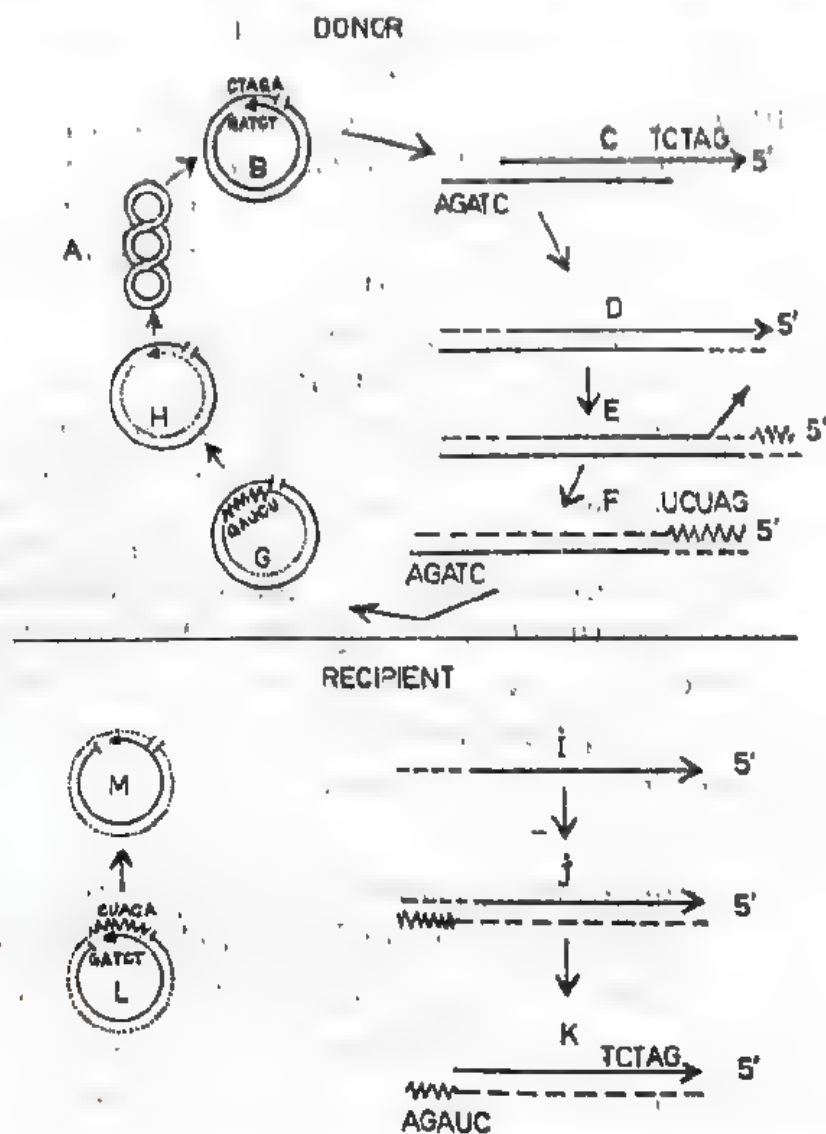


Fig. 40. Modelul replicării și al transferului DNA plasmidic utilizînd DNA liniar ca matrită (după Curtiss și Fenwick, 1975).

formă într-un duplex liniar bicatenar (fig. 40, D). Se consideră că moleculele de acest fel se acumulează pe membrana celulară interioară.

În continuare, se postulează sinteza unui RNA „primer” la capătul 5'-terminal (fig. 40, E). Fixarea RNA-polimerazei se face în zona capătului coeziv, iar secvența nucleotidelor din acest loc trebuie să conțină situsul de inițiere a sintezei pentru RNA „primer”. Într-o altă variantă ar exista o proteină-inițiator la capătul 5'-terminal, care ar specifica locul de fixare a RNA-polimerazei. Odată ce se sintetizează catena complementară, o catenă de DNA plasmidic se transferă la o celulă recipientă (fig. 40, I), iar molecula bicatenară liniară rămîne

atașată de membrana celulară a celulei donoare. În această etapă se iau în considerare două posibilități pentru reformarea ca donor a DNA plasmidic circular.

Prima dintre acestea, ilustrată în fig. 40, *G—H*, presupune că o exonuclează digere capătul 3' al duplexului pentru a forma o moleculă circulară deschisă, păstrând RNA „primer” (fig. 40, *G*), care este apoi îndepărtat și înlocuit de DNA (fig. 40, *H*).

A doua posibilitate ar fi ca o exonuclează să digere capătul 5' al moleculei, formând o structură circulară deschisă de DNA plasmidic, fără ca acesta să conțină RNA. Indiferent de alternativa prin care a luat naștere DNA circular deschis, în final acesta este convertit în formă *CCI* (fig. 40, *A*), așa cum se află el în citoplasmă.

Trecând acum la evenimentele din celula recipientă, modelul descris presupune că DNA plasmidic monocatenar transferat de la donor se atașează de membrana celulară internă (fig. 40, *I*), loc în care, cu ajutorul unui RNA „primer”, se sintetizează catena complementară a DNA plasmidic (fig. 40, *J*). În continuare, circularizarea DNA plasmidic în celula recipient presupune acțiunea unei exonucleaze, care digere nucleotidele 3' pentru a forma capetele coezive. Se formează astfel întâi o moleculă circulară deschisă conținând RNA „primer” (fig. 40, *L*), care este convertită într-o moleculă circulară deschisă, iar RNA „primer” este înlocuit cu segmentul corespunzător de DNA (fig. 40, *M*). În final, această moleculă trece în DNA *CCI*, formă în care el se găsește liber în citoplasmă (v. fig. 40, *A*).

Modelul pentru replicarea și transferul DNA plasmidic prezentat în fig. 40 se bazează în principal pe rolul DNA liniar bicatenar ca intermediar de replicare. Alegerea acestui intermediar s-a făcut pe baza observației că mulți DNA fagici ciclici au structură bicatenară liniară atît în timpul replicării, cît și într-o bună parte din ciclul lor de viață.

**V.1.6.1. Rolul complexilor de relaxare în replicarea DNA plasmidic.** Procesele biochimice care au loc la originea replicării DNA plasmidic sînt insuficient de cunoscute în momentul de față. Un fapt este însă clar și anume că scindarea uneia sau a ambelor catene de DNA trebuie să se realizeze în timpul replicării cu scopul de a permite dezrăsucirea și separarea catenelor nou scindate. Un candidat pentru această funcție de scindare este complexul de relaxare a DNA plasmidic superîncolăcit, descris pentru plasmidele *Col*, *R* și factorul de sex *F*.

Proprietatea principală a complexului de relaxare a DNA plasmidic izolat din celule de *E. coli* este conversia DNA plasmidic superîncolăcit la o formă circulară deschisă.



Analiza proteinelor din complexul de relaxare a pus în evidență trei componente cu masele moleculare relative de 60 000, 16 000 și 11 000. Este de reținut faptul că după tratamentul cu DDS al complexului de relaxare, proteina de 60 000 daltoni rămâne asociată cu catena scindată a DNA circular deschis, ceea ce sugerează că această proteină este legată covalent de catena de DNA. Se consideră că proteina de 60 000

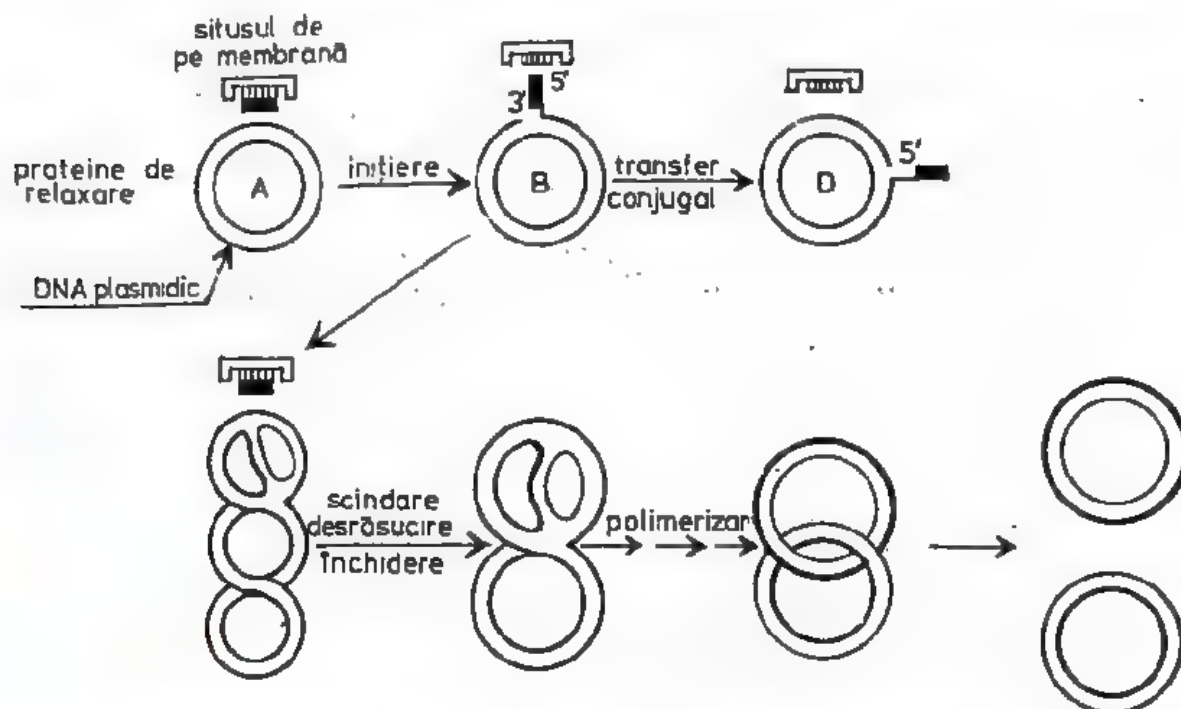


Fig. 41. Prezentarea schematică a rolului complexului de relaxare în replicarea și transferul DNA plasmidic (după Helinski și colab., 1974).

ar putea avea două activități: una de endonuclează și alta de transferază. În ceea ce privește celelalte două proteine, ambele sau numai una dintre ele ar putea avea funcția unui represor al activității endonucleazice a proteinei de 60 000 daltoni (Helinski și colab., 1974).

Rolul posibil al complexului de relaxare în replicarea și transferul conjugal al DNA plasmidic este prezentat în fig. 41. În acest model se propun mai multe funcții pentru complexul de relaxare și anume: promovează asocierea DNA plasmidic cu situsul de replicare de pe membrană (A), catalizează atât scindarea unei catene a DNA plasmidic în locul specificat de către un „semnal”, cât și formarea legăturii covalente între componenta proteică și capătul 5'-terminal al catenei scindate (B), închide catena scindată după dezrăsucirea catenelor de DNA (C), facilitează transferul catenei scindate în celula recipientă în timpul conjugării bacteriene (*bacterial motion*) (D).

Se consideră că legarea proteinei de DNA mai are și rolul de a determina conservarea conținutului ridicat de energie a legăturii fosfodiesterice scindate, de a proteja catena scindată de acțiunea exonucleazelor și de a facilita transferul DNA plasmidic la celula recipientă.

### V.1.7. Mobilizarea (transferul) plasmidelor curenț folosite în tehnologia DNA recombinant

Cercetări curențe au arătat că mobilizarea plasmidelor nu se face accidental sau printr-un proces pasiv. Întrucât plasmidele *Col E*<sub>1</sub> și unele derivate ale sale ca *pMB9*, *RSF2124*, *pBR313* și altele sînt curenț folosite ca vectori pentru a introduce DNA străin în *E. coli*, se va prezenta mecanismul mobilizării acestui tip de plasmidă.

De obicei, *Col E*<sub>1</sub> (masa moleculară  $4,2 \times 10^6$  daltoni), care codifică producția de colicină *E*<sub>1</sub>, este mobilizată cu o eficiență mai mare de 50% de către factorul de sex *F*, pentru că peste jumătate din celulele receptoare care primesc *F* conțin și *Col E*<sub>1</sub>.

Conform unor date noi, *Col E*<sub>1</sub> conține o zonă moleculară clar definită care este implicată în mobilizarea plasmidei (fig. 42). Atît inser-

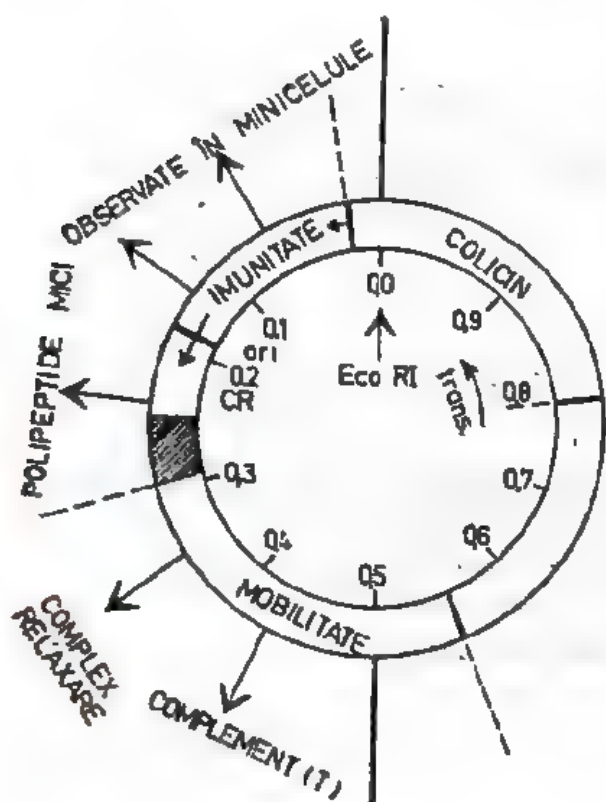


Fig. 42. Harta funcțională a plasmidei *Col E*<sub>1</sub> ( $4,5 \cdot 10^6$  daltoni).

țiile, cît și delețiile din aceste regiuni conduc la apariția de fenotipuri (*mob*<sup>-</sup>): mai puțin de 1 din  $10^5$  recipienți primesc o plasmidă *Col E*<sub>1</sub> *mob*<sup>-</sup> față de *Col E*<sub>1</sub> *mob*<sup>+</sup>.

Insertiile lîngă poziția 0,27 (zona hașurată din fig. 42) în cazul plasmidei *RSF2124*, îi modifică mobilitatea. Mutanții *Col E*<sub>1</sub> *mob*<sup>-</sup> au cantități mici de complex de relaxare (complex proteic găsit în DNA *Col E*<sub>1</sub>) capabil de a introduce o creștătură într-o catenă de DNA plasmidic. Această observație sugerează rolul complexului de relaxare în procesul de mobilizare.

## VI.1. Izolarea pasagerilor cu enzime specifice

Metoda cea mai simplă de a obține un pasager constă în fragmentarea specifică a genomului unui organism, urmată de selecția și purificarea fragmentului care conține pasagerul respectiv. Metoda poate fi aplicată direct numai dacă:

- a) genomul poate fi izolat și purificat;
- b) harta genetică a organismului respectiv este cunoscută parțial sau total;
- c) mijloacele utilizate pentru scindarea specifică a genomului nu distrug structura și funcția biologică a pasagerului de interes.

Cele trei condiții sînt satisfăcute numai în relativ puține situații. Acestea se rezumă de regulă la unele bacterii cum este *E. coli* și unele virusuri (SV40, bacteriofagul  $\lambda$ ) care au fost intens studiate și, în consecință, harta lor genetică elucidată. În aceste cazuri se aplică cu mult succes metoda izolării pasagerilor, în special cu ajutorul unor enzime specifice care permit astăzi realizarea unei disecții rapide a moleculelor de DNA.

### VI.1.1. Izolarea cu enzime de restricție

Între enzimele specifice folosite pentru izolare de pasageri, enzimele de restricție ocupă un loc cu totul aparte. Dată fiind importanța lor deosebită pentru tehnologia DNA recombinant ele sînt tratate într-un capitol special, motiv pentru care aici vom reda doar principiul întrebuintării lor pentru izolarea de pasageri: genomul este scindat cu o enzimă (sau mai multe) de restricție, iar fragmentele obținute sînt purificate prin metoda electroforezei în gel de agaroză. După identificare, fragmentul (pasagerul) de interes este apoi eluat din gel și utilizat pentru construcția DNA recombinant.

Majoritatea organismelor eucariote nu au încă mapa genetică cunoscută. Aceasta nu înseamnă însă că din genomul acestor organisme nu se pot izola unii pasageri. În acest caz, alături de metoda enzimatică (v. reverstranscriptaza) sau cea chimică, se poate aplica și o metodă indirectă. Ea constă în principiu din fragmentarea la întîmplare a genomului cu enzima de restricție și selecția pasagerului prin tehnica hibridizării DNA-RNA. O astfel de metodă au folosit Maxam și colab. (1977) pentru izolarea genei RNA ribozomal de 5 S din drojdie. S-a izolat DNA din tulpina diploidă de drojdie *A364a* + *D4* care a fost fragmentat mecanic. Fragmentele obținute au fost introduse într-o serie de plasmide. Acestea au fost la rîndul lor fragmentate cu enzima de restricție *Eco RI*, iar fragmentele rezultate au fost supuse testului de hibridizare cu RNA ribozomali de 5 S, 5,8 S, 18 S și 28 S. Dintre toate fragmentele existente



numai fragmentul denumit *B*, avînd o lungime de 2 600 perechi de nucleotide, s-a hibridizat cu molecula de rRNA 5 S. De aici s-a dedus că fragmentul *B* conține gena rRNA de 5 S.

## VI.1.2. Alte metode enzimaticice

Hegden și colab. (1972) au propus o metodă ingenioasă de localizare și separare a locului de legare a RNA polimerazei de DNA. În acest scop ei au tratat DNA cu RNA polimerază, iar complexul rezultat a fost supus acțiunii DN-azei. Această nuclează a hidrolizat molecula de DNA cu excepția porțiunii de moleculă care a interacționat cu RNA polimeraza. În continuare, porțiunea de DNA protejată, care este de fapt tocmai situsul de legare a RNA polimerazei de DNA, a fost separată de fragmentele de DNA digerate de DN-ază prin trecerea amestecului peste o coloană de Sephadex G-100.

Pe un principiu asemănător se bazează și izolarea unor operatori. În acest caz se pune în contact operatorul cu represorul său pentru a se forma un complex care protejează selectiv operatorul de acțiunea distructivă a unor enzime. Pirrotta (1973) realizează izolarea operatorului *lac* din bacteriofagul  $\lambda$  în felul următor: DNA din fagul  $\lambda$  este fragmentat prin ultrasonicare. Se obțin fragmente cu masa moleculară de  $3-6 \times 10^5$  daltoni. Acestea sînt întii tratate cu represorul operatorului *lac* și apoi trecute peste o membrană de nitroceluloză. Pe membrană rămîn numai fragmentele de DNA complexate cu represor, iar celelalte trec prin membrană. Fragmentele de DNA complexate cu represor sînt îndepărtate de pe filtru cu ajutorul dodecilsulfatului (DDS). După îndepărtarea DDS, ele fiind disociate de represor sînt din nou complexate cu represor, tratate cu DN-ază timp de 2 min. la 6°C. Amestecul se filtrează rapid printr-o membrană de nitroceluloză și se spală. Extracția operatorului pur se face în final cu un tampon conținînd DDS

## VI.2. Sinteza enzimatică a pasagerilor

### VI.2.1. Transferul de informație de la RNA la DNA

Pînă în jurul anului 1970 se considera că în organismele procariote și eucariote fluxul informației genetice se transmite numai în sensul precizat de relația:



care reprezintă de fapt dogma centrală a geneticii moleculare. Este meritul incontestabil a lui Temin de a fi convins cu experiențele sale întreaga lume științifică că, în relația de sus, este mai corect să fie așezate două săgeți între DNA și RNA: una îndreptată spre RNA, iar cealaltă spre DNA, întrucât informația genetică poate fi transmisă în ambele sensuri

$$\text{RNA} \rightleftharpoons \text{DNA}.$$

Sau, cu alte cuvinte, este posibil ca un RNA să fie modelul sau matrița pentru a sintetiza un DNA. Mai mult chiar, fără să fi urmărit în mod special această idee, Temin a reușit să descopere în același timp, însă alături de alte procese biologice importante, o cale nouă și nesperată de a sintetiza molecule de DNA folosind ca matrițe moleculele de RNA.

Descoperirile lui Temin au fost făcute pe virusuri tumorale RNA. Efectuând studii radiobiologice și de altă natură, el a dedus că trebuie să existe o relație genetică stabilă între genomul virusului sarcomului Rous (virus tumoral RNA) și celula gazdă. Pe baza acestor studii el a emis ipoteza că virusurile tumorale RNA se multiplică cu ajutorul unui DNA intermediar care se integrează în celula gazdă. La început, foarte puțini au luat în serios această ipoteză a lui Temin, deoarece nimeni nu credea în posibilitatea capacității RNA de a codifica DNA. Dar, încăpăținarea lui Temin a fost în final încununată de succes, pentru că în momentul în care s-a descoperit în virusurile tumorale RNA o enzimă specială — o DNA polimerază RNA dependentă denumită și reverstranscriptază — posibilitatea transferului de informație de la RNA la DNA a fost general acceptată. Dată fiind importanța deosebită a reverstranscriptazei pentru sinteza de pasageri, vom reda întâi unele detalii privind identificarea și caracterizarea ei în virusurile tumorale RNA, ca apoi în final să prezentăm modul ei de folosire pentru sinteza de pasageri (gene).

## VI.2.2. Unele proprietăți generale ale virusurilor tumorale RNA

Virusurile tumorale RNA sînt virusuri animale ai căror virioni conțin un genom RNA și o DNA polimerază. Ele au fost izolate de la reptile, păsări și diferite animale. Este important de precizat că virusurile de acest tip nu au fost izolate de la om.

Caracteristica principală a acestor virusuri este aceea că produc leucemii, sarcoame, carcinoame, infecții letale rapide cu anemie și necroză, infecții lente ale sistemului nervos și plămînilor și cel mai frecvent fără boală.

Se numesc virusuri tumorale deoarece o parte din aceste virusuri sînt oncogene. Totuși nu toate aceste virusuri produc tumori. Ele se mai numesc și leucovirusuri, Rous-virusuri, oncornavirusuri, retrovirusuri, ambivirusuri, oncovirusuri și ribodeoxivirusuri. În ultimul timp

denumirea de *ribodeoxivirusuri* pare a fi preferată față de celelalte (Temin, 1974).

Ribodeoxivirusurile prezintă o importanță deosebită din următoarele motive principale:

1) sînt singurele organisme în care transferul informației genetice are loc în sensul  $RNA \rightarrow DNA \rightarrow RNA$ , deoarece posedă o enzimă care realizează sinteza de DNA pe model de RNA;

2) unele din aceste virusuri, cum este virusul sarcomului Rous, sînt cei mai eficienți agenți carcinogeni cunoscuți pentru animale sau culturi celulare;

3) unele virusuri de acest fel sînt cauza directă a unor cancere „naturale” la pui și șoareci.

### VI.2.3. Descoperirea DNA polimerazei RNA dependentă (reverstranscriptază)\*

Lucrările lui Temin și colaboratorii săi au deschis un orizont nebănuit în biologia moleculară. Datorită originalității lor ele au fost răsplătite în anul 1976 cu Premiul Nobel pentru fiziologie și medicină. Aceste lucrări au pus bazele înțelegerii mecanismului de transformare a celulelor normale în celule neoplazice prin intermediul virusurilor RNA oncogene și, ceea ce interesează în mod deosebit tehnologia DNA recombinant, au arătat posibilitatea transferului de informație de la RNA la DNA.

În anul 1963, Temin — studiind efectele actinomicinei *D* asupra multiplicării virusului sarcomului Rous (VSR) — a constatat că atât producerea de virus, cît și sinteza RNA sînt inhibate de către actinomicina *D*.

Această constatare era în totală contradicție cu cunoștințele existente la acea dată privind efectul actinomicinei *D* asupra multiplicării virusurilor RNA. Întrucît actinomicina *D* inhibă sinteza de RNA dependentă de DNA, toate virusurile RNA (cu excepția virusului gripal) multiplicîndu-se prin intermediul RNA-bicatenar sînt insensibile față de acest antibiotic. Or, producerea VSR fiind sensibilă la actinomicină rezultă că în cursul multiplicării VSR intervine, printr-un mecanism necunoscut, un DNA care participă la sinteza RNA viral. Cum VSR conține numai RNA, aceasta înseamnă că acest RNA generează într-o anumită etapă un DNA necesar multiplicării virusului.

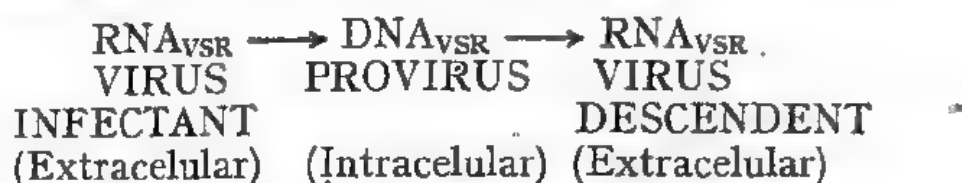
---

\*DNA polimeraza RNA dependentă este denumită și reverstranscriptază, deoarece transcrie informația genetică invers față de transcriptaza obișnuită care realizează transferul informației de la DNA la RNA.



Ulterior s-a constatat că inhibiția multiplicării VSR se datorește atât inhibiției sintezei DNA celular, ceea ce conduce de fapt la împiedicarea multiplicării celulare, cât și inhibiției sintezei unui DNA dirijată de virus.

Datele obținute au condus la formularea ipotezei *provirusului*, conform căreia replicarea virusului sarcomului Rous implică întâi formarea unui DNA cu rol de intermediar care, pe de o parte, se multiplică odată cu multiplicarea celulară prin transferul de informație DNA → DNA, iar pe de altă parte prin transferul de informație DNA → RNA, când participă la sinteza RNA din virusul descendent (Temin, 1970). Această ipoteză poate fi redată schematic astfel:



Cu alte cuvinte, când un virus tumoral RNA infectează o celulă, genomul viral RNA este transcris într-un genom viral DNA, care devine o parte integrantă din genomul celular (provirusul). În etapa finală, genomul viral DNA este transcris în genomul viral RNA realizându-se în acest fel ceea ce părea imposibil pînă atunci, și anume, transferul de informație de la RNA la DNA și de aici din nou la RNA. Reamintim aici că dogma centrală a biologiei moleculare considera posibil numai transferul de informație în sensul DNA → RNA → proteină.

Odată cu acumularea datelor experimentale menționate, precum și cu apariția altora de același fel, s-a pus întrebarea: care este natura enzimei responsabilă pentru sinteza de DNA dependentă de RNA din virusul sarcomului Rous? Primele experiențe efectuate în acest sens au stabilit că sinteza de DNA dependentă de VSR nu este condiționată de o sinteză proteică nouă. În etapa următoare a cercetărilor s-a ajuns însă chiar la descoperirea unei enzime noi, avînd proprietatea de a sintetiza DNA pe modelul RNA viral, motiv pentru care ea a fost denumită DNA polimerază RNA dependentă (Temin și Mizutani, 1970; Baltimore, 1970).

**VI.2.3.1. Proprietățile DNA polimerazei RNA dependentă.** Activitatea DNA polimerazei RNA dependentă poate fi măsurată fie în absența unei matrițe adăugate, și în acest caz se vorbește de o *reacție endogenă* (RNA viral servește ca matriță), fie atunci când se adaugă un acid nucleic străin (sau exterior) la virusul disrupt sau la enzima purificată, iar reacția se numește în acest caz *exogenă*. Reacția exogenă decurge mult mai repede decît cea endogenă. Fără îndoială că reacția endogenă este importantă pentru implicațiile sale biologice deosebite în care este implicată, iar reacția exogenă este importantă pentru sinteza de molecule de DNA pe matrițe de RNA.

Este bine de precizat că DNA polimeraza dependentă de RNA se găsește și în celule normale, neinfectate cu virus.

a) *Localizarea și purificarea DNA polimerazei RNA dependente.* DNA polimeraza este situată în interiorul particulei virale (fig. 57). Tratamentul virusului cu detergenți în prezența unor săruri în concen-

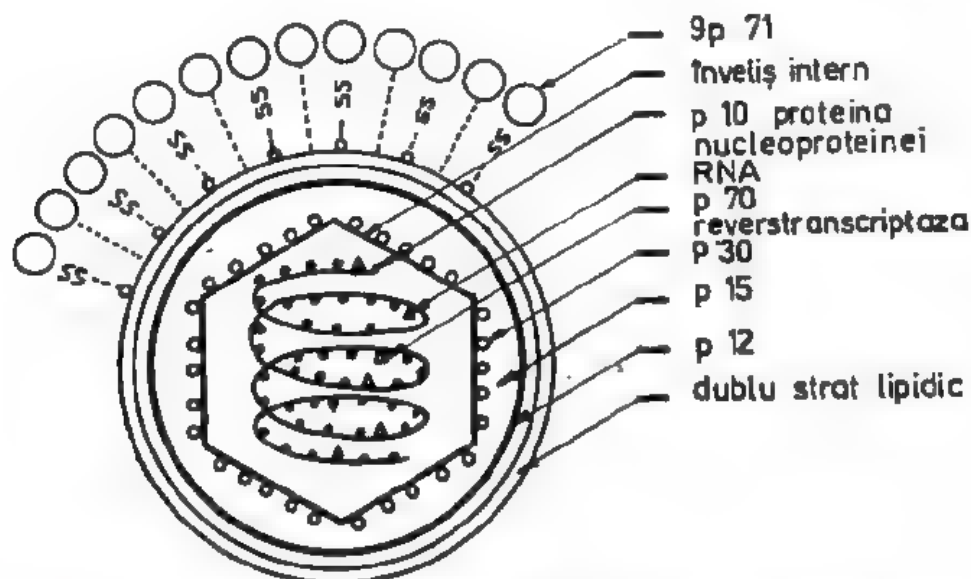


Fig. 57. Structura oncornavirusurilor de tip C murin (după Bolognesi și colab., 1977).

trație mai mare de 0,1 M determină ca învelișul lipidic al virusului să fie distrus, iar activitatea enzimatică se pune în evidență atât în miezul virionului, cât și în fracțiunea solubilizată sub formă de enzimă solubilă (Coffin și Temin, 1971). Alți autori, cum sînt Kacian și colab. (1971), recomandă concentrații relativ mari de detergenți și săruri (0,7% dezoxicolat, 7% Nonidet P-40 și KCl 0,8 M) pentru izolarea enzimei. S-a constatat însă că este suficient ca virusul să fie tratat cu eter sau cu detergenți neionici în prezența a mai puțin de 0,1 M sare, ca să se elibereze cantități semnificative de enzimă solubilă. Aceasta ar putea deriva din miezul virionilor sau s-ar putea ca ea să existe în stare solubilă în virionii intacti.

Purificarea enzimei solubile s-a făcut prin combinarea mai multor procedee de purificare utilizînd schimbători de ioni, ultracentrifugare, gel-filtrări și precipitări selective (Verma și colab., 1971).

b) *Activitatea enzimei în virioni.* Virusurile tumorale RNA au în mod obișnuit o activitate polimerazică, dar dacă ei sînt disrupti cu detergenți activitatea polimerazică crește de 20 pînă la 50 ori. Această creștere se datorește distrugerii învelișului virusului și eliberării polimerazei care poate astfel interacționa cu substratul (nucleozidtrifosfații) după cum se va arăta în continuare.

Activitatea enzimatică este dependentă de concentrația de detergenți. Leucovirusurile aviare și murine se comportă diferit atît față de



cantitatea de detergenți necesară pentru obținerea enzimei, cât și în ceea ce privește efectul inhibitor al excesului de detergenți. Acțiunea inhibitoare a excesului de detergenți se datorește în acest caz disocierii polimerazei de pe matrită. Pentru a împiedica această disociere, se recomandă ca detergentul să se adauge numai în cantitate necesară desfacerii învelișului virionilor.

c) *Substraturile enzimei.* Reacția endogenă de sinteză a DNA depinde de prezența celor patru dezoxiribonucleozidtrifosfați. Absența unuia din cei patru dezoxiribonucleozidtrifosfați determină ca sinteza de DNA să nu aibă loc (Temin și Baltimore, 1972).

Ribonucleozidtrifosfații nu pot înlocui dezoxiribonucleozidtrifosfații (Baltimore, 1971; Temin și Mizutani, 1970). Până în prezent nu s-a obținut sinteza unui produs acido-insolubil din ribonucleozidtrifosfați și virioni din virusuri tumorale RNA. De asemenea, în prezența celor patru dezoxiribonucleozidtrifosfați și a DNA, încorporarea ribonucleozidtrifosfaților marcați într-un produs acido-insolubil nu are loc.

Sinteza de DNA este mult stimulată de prezența ATP și a sistemelor generatoare de ATP (Temin și Mizutani, 1970). Sistemele generatoare de ATP mai au și proprietatea de a stabiliza reacția în timpul unei incubării mai îndelungate.

Rolul ATP și al sistemelor generatoare de ATP pare să fie acela de substrat pentru nucleotidfosfataza prezentă în preparatele de virioni purificate și care hidrolizează trifosfații marcați sau este posibil ca ei să servească ca substrat pentru un sistem nucleotidkinazic, de asemenea descoperit în preparatele virale.

Prin urmare, se poate conchide că ATP ar avea un rol indirect în stimularea activității polimerazice prin reglarea pe care o exercită asupra nivelului substratului.

d) *Cationii bivalenți și monovalenți.* Sinteza de DNA dirijată de virioni este dependentă de prezența ionilor bivalenți. Ionii de  $Mg^{2+}$  în concentrații de 5—10 mM și ionii de  $Mn^{2+}$  în concentrații de 1—2 mM stimulează sinteza de DNA.  $Cu^{2+}$  nu are efect asupra reacției enzimatice.

Spre deosebire de ionii bivalenți care sînt absolut necesari, ionii monovalenți nu par a fi absolut necesari reacției enzimatice. S-a observat însă că reacția este stimulată cu 15—20% de concentrațiile scăzute (de ordinul a 20—30 mM) de sodiu sau potasiu. Dacă concentrația acestor ioni este mai ridicată, în loc să stimuleze ei inhibă reacția enzimatică. Este foarte posibil ca efectul inhibitor al concentrațiilor ridicate de ioni monovalenți să se datoreze disocierii DNA polimerazei de pe RNA endogen.

e) *pH optim.* Toate virusurile oncogene testate au arătat o activitate optimă a DNA polimerazei lor în jurul pH 8. S-a observat însă că activitatea enzimei se întinde peste un domeniu relativ larg de pH.

f) *Temperatura optimă.* S-a constatat că reacția endogenă are loc la o anumită temperatură optimă. Există însă o activitate enzimatică



mai ridicată la temperaturi cuprinse între  $37^{\circ}$  și  $40^{\circ}\text{C}$  în cazul virusurilor animale și cuprinse între  $40^{\circ}$ — $45^{\circ}\text{C}$  pentru virusurile aviare. Întrucât gazda aviară are o temperatură mai ridicată decât cea animală, diferențele observate în ceea ce privește temperatura optimă a DNA polimerazei la cele două gazde de virusuri au făcut să se presupună că aceasta ar reflecta de fapt diferențe existente între virusuri.

**VI. 2.3.2. Proprietățile DNA polimerazei RNA dependentă purificată.** Așa cum am arătat, enzima solubilă se poate izola din virionii disociați cu detergenți și săruri cu ajutorul cromatografiei cu schimbători de ioni, ultracentrifugării în gradient de glicerol și al gel filtrării.

Mărimea DNA polimerazei s-a dovedit a fi dependentă de originea virusului din care a fost extrasă. Ross și colab. (1971) au arătat că enzima din virusul murin are 70 000 daltoni, valoare estimată atât prin gel filtrare, cât și prin ultracentrifugare. O valoare apropiată — 90 000 daltoni — stabilesc Hurwitz și Leis (1972) pentru aceeași enzimă.

Enzima izolată și purificată din virusurile aviare este mai mare; valorile obținute variază între 110 000 și 180 000 daltoni. Temin și Baltimore (1972) consideră că valoare de 180 000 daltoni ar fi cea mai corectă pentru această enzimă. Analiza electroforetică a enzimei a pus în evidență prezența în preparatele purificate a două polipeptide, care par a fi subunitățile enzimei. Pentru enzima de origine murină se consideră că subunitatea este de 70 000 daltoni, în timp ce enzima de origine aviară are aceeași subunitate de 70 000, alături de o a doua subunitate de 110 000 daltoni.

Aspectele structurale ale enzimei nu pot fi încă discutate în detaliu, deoarece se cunosc puține date care pot fundamenta o astfel de discuție. Trebuie însă precizat că DNA polimeraza RNA dependentă reprezintă numai aproximativ 1% din proteinele virale.

*a) Matricele DNA polimerazei purificate.* Polinucleotidul monocatenar de tip poli(dA) nu poate fi utilizat ca matriță pentru DNA polimerază. În schimb, dacă acestui polinucleotid i se adaugă poli(dT) el devine foarte eficient în această funcție. Baltimore și Smaler (1971). Pe de altă parte, Mizutani și colab. (1971), precum și alți autori, au arătat că atât RNA, cât și DNA pot fi utilizați ca matrice pentru DNA polimerază.

Hurwitz și Leis (1972), pe baza propriilor lor rezultate obținute, susțin că DNA bicatenar nu este eficient ca matriță. Chiar o scindare a uneia dintre catene nu este suficientă pentru a-i conferi proprietatea de matriță. În schimb, proprietatea de matriță a DNA devine efectivă numai atunci când în polimerul bicatenar există o zonă monocatenară sub formă de buclă.

DNA polimeraza I din *E. coli* are și ea proprietatea de a copia DNA monocatenar. Aceasta deoarece DNA monocatenar formează unele zone bicatenare intramoleculare prin interacțiunea bazelor din

același lanț, dînd naștere la unele „bucle” de-a lungul moleculei (Englund, 1971).

b) *Prezența agenților reducători.* Atît ditiotreitoul, cît și  $\beta$ -mercapto-etanolul stimulează activitatea enzimatică. Numai în prezența agenților reducători, activitatea enzimatică poate fi total exprimată. Cum acești agenți interacționează cu grupările —SH ale enzimei, blocarea acestora determină o modificare conformațională a enzimei determinînd prin aceasta ca centrii activi să intervină mai eficient în reacția de polimerizare.

c) *Efectul ribonucleazei.* Concentrații mici de RN-ază nu afectează activitatea polimerazică. În schimb, concentrații de 3—50  $\mu\text{g/ml}$  produc o inhibiție de 75% a sistemului de sinteză a DNA prin intermediul DNA polimerazei RNA dependentă, care folosește ca matriță RNA. Concentrațiile mici de RN-ază fragmentează matrița în porțiuni relativ mari, care pot să catalizeze reacția enzimatică. Crescînd concentrația enzimei, fragmentele de RNA produse sînt mici, iar acestea nu își mai pot îndeplini funcția de matriță (McDonnell și colab. 1970).

d) *Cinetica reacției.* S-a observat că cinetica reacției dirijată de DNA polimerază depinde în principal de cantitatea de substrat, deoarece fosfatazele existente în preparatele virale micșorează rapid concentrația substratului prin eliberarea de fosfat, cît și de concentrația și stabilitatea matriței (RNA), care este fragmentat de ribonucleazele din virion. Cinetica pare a fi proporțională cu concentrația de proteină din virioni, Temin și Baltimore (1972).

e) *Mecanismul reacției enzimatice.* DNA polimerazele, indiferent dacă sînt dependente de DNA (cazul biosintezei DNA celular) sau RNA (reverstranscriptaza), sînt enzime dependente de un primer și pot copia numai regiuni monocatenare ale matriței. Este curios faptul că polinucleotide total monocatenare sau bicatenare nu pot fi utilizate ca primeri. Dar, adaosul catenei complementare la catena monocatenară determină conversia ei, într-o matriță eficientă (Baltimore și Smaler 1971). Pe de altă parte, pot fi utilizate și polinucleotide bicatenare ca matriță, cu condiția să fie tratate cu DNA polimerază din *E. coli*, care are proprietatea de a produce deplasări ale catenelor DNA (Masamune și Richardson, 1971).

De asemenea, pot funcționa ca matrițe fie DNA monocatenar care formează „bucle” (Englund, 1971), fie copolimeri de tipul poli(dA-dT) care prin structura lor secundară — datorită interacțiunilor intracatenare ale polimerului — oferă unele zone monocatenare care pot servi ca locuri de inițiere a sintezei.

f) *Rolul de matriță a RNA viral.* Matrița naturală pentru DNA polimerază a virusurilor tumorale RNA este RNA viral 60—70 S, un complex care conține trei sau patru subunități de RNA cu mase moleculare mari (de aproximativ 35 S) și mai mulți RNA cu masă moleculară mică (5 S și 4 S). Aceștia din urmă sînt fie liberi, fie asociați cu compo-



nente de 70 S (RNA 70 S — 4 S). Ultimele cercetări arată că transcrierea DNA de pe RNA 70 S este inițiată de capătul 3' al moleculei de RNA-4 S care este legat prin legături de hidrogen de genomul viral (Dahlberg și colab., 1974).

g) *Produsul reacției*. Nucleaza din *Neurospora* digeră numai DNA monocatenar. Supus analizei cu această enzimă, produsul de reacție obținut, după aproximativ 20 de minute de sinteză, a arătat că este format atât dintr-un hibrid de DNA-RNA, cât și dintr-un DNA bicatenar (Manley și colab., 1971).

Trebuie precizat că produsul inițial al reacției, analizat într-un gradient de zaharoză, are un coeficient de sedimentare de 60—70 S, la fel ca și marea majoritate a RNA viral.

Ulterior, în timpul sintezei, probabil datorită acțiunii ribonucleazei virale, acest material este înlocuit de unul care sedimentează sub 10 S.

Prin urmare, produsul inițial al reacției este un complex molecular de 60—70 S compus din matrița de RNA și piese relativ mici de DNA nou sintetizate. După mai multe ore de incubare se sintetizează numai DNA pur, care este monocatenar și parțial bicatenar.

Pentru a explica dimensiunea mică a DNA sintetizat s-au emis mai multe ipoteze. Pe de o parte se presupune că unele scindări ale matriței ar atrage după sine sinteza unui DNA relativ mic, iar pe de altă parte există posibilitatea ca fragmentele mici de DNA să fie intermediari ai sintezei provirusului, pe care DNA ligazele virale le asamblează în structuri mai mari.

**VI.2.3.3. Inhibitori ai reverstranscriptazei.** *Actinomicina D*. Este cunoscut faptul că actinomicina *D* interacționează cu DNA, dar nu și cu RNA. Pentru acest motiv, sinteza polinucleotidelor dependente de DNA este inhibată, în timp ce sinteza dependentă de RNA nu este influențată.

De asemenea, trebuie precizat că actinomicina *D* în concentrație scăzută determină inhibiția sintezei de RNA dependentă de DNA, iar sinteza de DNA dependentă de DNA este inhibată de concentrații relativ ridicate de antibiotic (Reich, 1964).

Or, reacția endogenă de sinteză a RNA dependentă de DNA, dirijată de DNA polimerază, s-a dovedit a fi inhibată numai de concentrații ridicate de actinomicină; la o concentrație de 20—50  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicină *D* mai rămâne încă 30—50% din activitatea inițială a enzimei. Interpretarea care se dă acestei comportări este următoarea: sinteza de DNA dependentă de RNA nu este afectată de actinomicină, deoarece aceasta nu interacționează cu RNA, în schimb actinomicina inhibă numai sinteza de DNA dependentă de DNA, iar aceasta se produce numai la concentrații ridicate de antibiotic.

Totodată, s-a constatat că produsul format în prezența actinomicinei *D* constă în principal din DNA monocatenar și hibridi DNA-RNA,



iar în absența actinomicinei se formează în special DNA bicatenar (Manley și colab., 1971).

*Derivații rifampicinei.* O serie de derivați ai rifampicinei s-au dovedit a fi chiar mai activi decât actinomicina *D* în inhibarea reverstranscriptazei. Se pare că acești derivați inhibă atât activitatea reverstranscriptazei dependentă de RNA cât și de DNA (Gurgo și colab., 1971).

**VI.2.3.4. Activitatea reverstranscriptazei din celulele neinfectate.** Coffin și Temin (1971) și apoi Chang și Temin (1972) au anunțat existența unei activități DNA polimerazice RNA dependentă, atât în cultura de fibroblaști de embrioni de șobolani, cât și în embrioni normali de pui. Activitatea este sensibilă la tratamentul cu ribonuclează, dar nu la acela cu deoxiribonuclează.

De aici s-a ajuns la generalizarea ideii că toate celulele au o enzimă capabilă de a dirija sinteza de DNA dependentă de RNA și că această enzimă nu are nimic comun cu DNA polimeraza celulară, ci mai degrabă cu DNA polimeraza virală din virusurile tumorale RNA.

Este dificil, pentru moment, de a se da o explicație pentru activitatea DNA polimerazică reverstranscriptazică a celulelor normale. Este posibil ca celula să aibă o origine dublă. Pe de o parte, această activitate poate fi prezentă în stare potențială în genomul celular neinfectat, pe de altă parte ea poate fi codificată de genomul viral. Nu se știe dacă inducția unui virus tumoral este rezultatul unei derepresii determinată numai de un provirus preformat, sau dacă inducția reprezintă un proces de recombinare și mutațional care conduce la formarea genomului viral.

În anul 1970, Temin a emis ipoteza *protovirusului* pentru a explica activitatea reverstranscriptazei din celulele neinfectate. Conform acestei ipoteze în celulele normale există un complex DNA polimerază-RNA (protovirusul), care are un rol special în dezvoltarea celulei. Virusurile tumorale RNA au derivat de la acest protovirus normal celular, iar în virionii virusurilor tumorale RNA, cât și în protovirusurile celulare, reverstranscriptazele sînt enzimele cheie care realizează transferul de informație.

**VI.2.3.5. Alte activități enzimatiche existente în virusurile tumorale RNA.** În afară de activitățile enzimatiche asociate cu multiplicarea virală, virusurile tumorale RNA conțin și alte activități enzimatiche, care numai în anumite situații sînt necesare virusului. Se pare că enzimele acestea nu sînt codificate de informația genetică prezentă în genomul viral.

a) *Ribonucleaza H.* Molling și colab. (1971) au arătat existența unei ribonucleaze asociate cu DNA polimeraza purificată din virusul mielo-blastozei aviare. Această enzimă degradează specific catena de RNA

dintr-un hibrid RNA-DNA și nu are efect asupra DNA sau asupra RNA monocatenar.

b) *Deoxiribonucleaza*. În tulpina Schmidt-Ruppin D a virusului sarcomului lui Rous, s-a descris o activitate dezoxiribonucleazică care a condus la scindarea DNA din fagul T7. S-au mai descris activități endo- și exonucleazice în diferite tulpini de virusuri tumorale RNA, dar ele nu au fost foarte bine caracterizate (Temin și Baltimore, 1972).

c) *DNA-ligaza*. Hurwitz și Leis (1972) au comunicat prezența activității ligazice în virionii virusului mieloblastozei aviare. Anterior însă, Mizutani și colab. (1971) au observat în nucleocapsida virionilor activitate ligazică, care a determinat legarea unor polinucleotide. Este de menționat de asemenea că prezența ligazei în virioni a fost postulată de Mizutani și colab. (1970) pentru a explica unele rezultate obținute cu endonucleaza DNA a virionilor. Acești autori au sugerat că ligaza ar putea ajuta la integrarea DNA proviral în DNA celular cu scopul de a produce un DNA mai mare din fragmentele de DNA produse de DNA polimeraza virală.

d) *Alte activități enzimatice* puse în evidență sînt: ATP-aza, protein-kinaza, nucleozidtrifosfatnucleotidiltransferaza, hexokinaza, lacticodehidrogenaza (Temin și Baltimore, 1972).

#### VI.2.4. Utilizarea reverstranscriptazei pentru sinteza pasagerilor (genelor)

Datele prezentate au arătat că reverstranscriptaza posedă patru activități enzimatice, care interesează sinteza și hidroliza moleculelor polinucleotidice:

1) activitate de DNA polimerază RNA dependentă, care conduce la sinteza de DNA pe model de RNA;

2) activitate de DNA polimerază DNA dependentă, care are ca efect sinteza de DNA bicatenar;

3) activitate RN-azică (*H*), care determină hidroliza RNA dintr-un hibrid DNA-RNA;

4) activitate de DNA-ligază.

Fără îndoială că pentru tehnologia DNA recombinant primele două activități sînt de interes, oferind posibilitatea de a sintetiza pasageri pe cale enzimatică. Sinteza aceasta este condiționată însă de posibilitățile existente azi, de izolare și purificare a mRNA, adică a celui mRNA care dirijează sinteza hormonului, enzimei sau proteinei planificate a fi produse de DNA recombinant.

Din păcate izolarea și purificarea mRNA nu este întotdeauna posibilă, ceea ce face ca sinteza cu ajutorul reverstranscriptazei să fie limitată numai la situațiile, relativ puține, în care se poate obține un mRNA



pur, cum este cazul mRNA pentru hemoglobină (Kacian, 1972), mRNA pentru imunoglobulină (Diggelman și colab., 1973), mRNA pentru insulină (Ullrich și colab., 1977) și câteva altele.

De notat de asemenea că sinteza pasagerilor — deci a moleculelor de DNA — pe model de mRNA, cu ajutorul reverstranscriptazei, determină în prima etapă sinteza unui DNA complementar (denumit pe scurt cDNA), avînd secvența bazelor complementară secvenței bazelor din mRNA și că reverstranscriptaza acționează în reacția exogenă pentru a produce cDNA pe model de mRNA numai atunci cînd este în prezența unui primer \*. Acesta trebuie să aibă o structură specială și anume să posede secvența bazelor sale complementară matriței.

Întrucît majoritatea (dacă nu toți) mRNA de eucariote conțin la capătul lor 3' secvențe de poli(A) ca primer, se întrebuintează un oligo(dT), fiind complementar cu poli(A). Primerul inițiază sinteza de cDNA de la capătul 3' al matriței, iar copierea mRNA începe din acest punct și se termină îndată ce întreaga moleculă de mRNA este transcrisă în molecula de cDNA.

Rezumînd, trăsăturile principale ale sintezei de DNA pe model de mRNA în prezența reverstranscriptazei sînt următoarele:

- 1) sinteza cDNA este dependentă de un primer care, de obicei, este oligo(dT);
- 2) produsul sintezei este un cDNA monocatenar, care este o copie fidelă a mRNA;
- 3) în prezența actinomicinei se sintetizează un cDNA, a cărui lungime este egală cu aceea a mRNA folosit ca matriță;
- 4) în absența actinomicinei D se sintetizează un DNA bicatenar cu masă moleculară mai mică decît a cDNA;
- 5) cDNA sintetizat are proprietatea de a fi atît primer, cît și matriță pentru sinteza de DNA bicatenar (Salser, 1974).

Această ultimă caracteristică a reacției catalizate de reverstranscriptază merită a fi discutată, deoarece de fapt ea stă la baza sintezei moleculelor bicatenare de DNA recombinant. S-a observat că utilizînd cDNA ca matriță și reverstranscriptaza ca enzimă pentru a sintetiza DNA bicatenar, reacția nu are nevoie de prezența oligo(dT) ca primer. Totodată, s-a precizat că produsul obținut este legat covalent de matriță și are o structură particulară, prezentînd unele bucle (Verma și colab., 1973).

Datele prezentate (precum și altele) au sugerat că cea mai mare parte a cDNA are o structură monocatenară, iar la capătul 3' există o buclă formată prin interacțiunea intramoleculară a bazelor (fig. 58).

\* Primer = inițiator al sintezei polinucleotidice.



Această moleculă servește la inițierea și sinteza moleculei de DNA bicatenar. Etapele principale ale sintezei de DNA pe model de RNA sînt prezentate schematic în fig. 58.

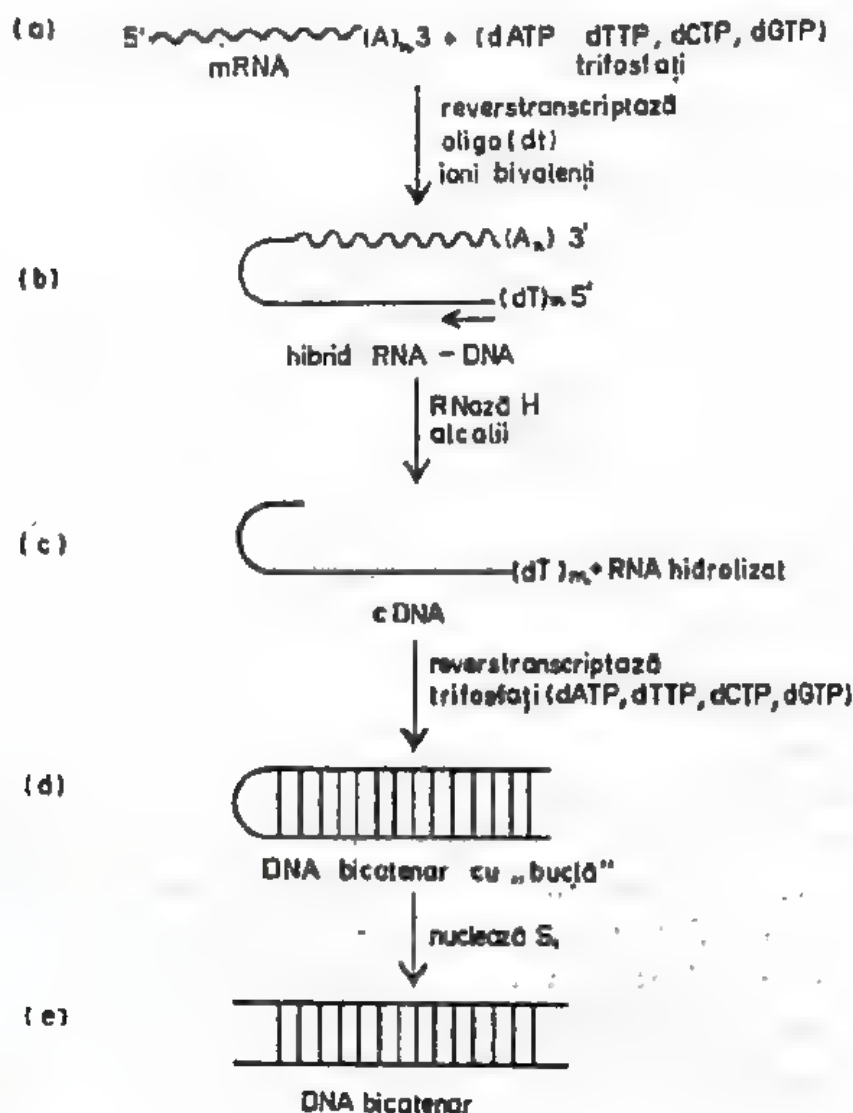


Fig. 58. Prezentarea schematică a sintezei pasagerilor cu ajutorul reverstranscriptazei:

a) amestecul de reacție conține: mRNA (matriță), oligo (dT) (primer), reverstranscriptază (enzimă), trifosfați (substrat) și ioni bivalenți; b) enzima sintetizează un hibrid mRNA-cDNA; c) componenta de RNA din hibrid este hidrolizată, fie enzimatic (preparatul de reverstranscriptază conține RN-ază H), fie chimic, cu alcalii, în urma cărui tratament se obține cDNA; acesta este monocatenar, iar la capătul 3' are o buclă; d) cDNA devine matriță și primer pentru prelungirea capătului 3' pînă cînd acesta ajunge egal cu capătul 5'; e) bucla se elimină prin tratamentul cu nuclează S<sub>1</sub>, care acționează la nivelul buclei, unde molecula are baze neinteracționate. În final, se obține molecula de DNA bicatenar (pasagerul), avînd secvența bazelor complementară moleculei de mRNA.

**VI.2.4.1. Purificarea mRNA necesar sintezei de pasageri (gene).** Posibilitatea sintezei enzimatică a pasagerilor cu ajutorul reverstranscriptazei depinde în principal de izolarea și purificarea mRNA. În majoritatea cazurilor izolarea mRNA s-a bazat pe separarea celulelor diferențiate care produc numai una sau două proteine diferite. De exemplu, în cazul insulelor lui Langerhaus majoritatea celulelor sînt de tip B, care sînt producătoare de insulină. Omogenatul obținut din aceste celule în prezența tiocianatului de guanidină (4 M) și  $\beta$ -mercaptoetanol (1 M), la pH 5, supus centrifugării în clorură de cesiu (5,7 M), permite separarea mRNA specific sintezei insulinei (Ullrich și colab., 1977).

Procedee asemănătoare s-au aplicat și pentru celulele care sintetizează ovalbumină, hemoglobină sau alte proteine.

A doua metodă generală de separare și purificare a mRNA se bazează pe specificitatea de interacțiune dintre anticorpii unei anumite proteine și polizomii care conțin lanțuri polipeptidice nascente ale proteinei respective.

Tratamentul polizomilor cu anticorpi specifici oferă posibilitatea precipitării selective numai a polizomilor de care sînt atașați mRNA care codifică sinteza proteinei de interes. Separarea mRNA din polizomi se face după disocierea polizomilor cu EDTA. Astfel, Delovich și colab. (1972) au reușit să izoleze mRNA specific catenei L a imunoglobulinei din plasmacitoma șoarecelui *MOPC<sub>149</sub>*, prin reacția polizomilor cu fragmente de *F(ab')*<sup>2</sup> obținute în urma tripsinizării antiserului de iepure anti-*MOPC<sub>149</sub>* catenă L. Alți autori au purificat  $\gamma$ -globuline antiovalbumină de pui (Palmiter, 1972) sau glutaminsintetază (Sarkar și Moscona, 1973), pentru a precipita selectiv mRNA specifici din polizomi. Acești mRNA purificați s-au dovedit a fi capabili să dirijeze sinteza *in vitro* a proteinelor specifice, dovedindu-se în acest fel și puritatea lor. Un dezavantaj al metodei constă în aceea că ea permite izolarea numai a mRNA atașați de ribozomi, specificitatea ei fiind limitată la polipeptidele nascente. Or, cantitatea de mRNA atașați de ribozomi este în general mică.

A treia metodă generală recomandată pentru izolarea de mRNA specific este cea descrisă de Stevens și Williamson (1973). Ea permite izolarea atât a mRNA, cît și a precursorilor lui, tot pe bază imunochimică.

### VI.3. Sinteza chimică a pasagerilor (genelor)

Sinteza moleculelor mari de DNA pe cale pur chimică nu s-a realizat încă datorită unor dificultăți care apar în principal la asamblarea chimică a catenelor lungi de polinucleotide. Aceste dificultăți au determinat ca sinteza totală a genei pentru tRNA<sup>Ala</sup>, realizată de grupul lui

Khorana (v. Agarwal și colab., 1970) sau cele mai recente lucrări ale grupului lui Itakura, privind sinteza genei pentru somatostatina (Itakura, și colab., 1977) sau a genelor pentru insulina (Crea și colab., 1978) să nu fie realizată numai prin metodele chimiei organice. În aceste cazuri a fost necesar să se combine metodele chimiei organice, care permit doar sinteza oligonucleotidelor cu o secvență dorită, cu concepte și metode proprii chimiei biologice, care la rândul lor au descoperit și dezvoltat metode specifice de legare a oligonucleotidelor între ele. Strategia adoptată atât de grupul lui Khorana, cât și de cel al lui Itakura pentru sinteza chimică a unor gene a implicat realizarea a două etape fundamentale și anume:

1) sinteza chimică a unor segmente de deoxipolinucleotide cu lungimea medie a catenei de 8—12 unități;

2) legarea cap la coadă a segmentelor corespunzătoare de deoxipolinucleotide cu ajutorul DNA-ligazei.

Prima etapă este realizată cu ajutorul metodelor chimiei organice, în timp ce a doua se realizează prin metode enzimatică. Întrucât întreaga moleculă de DNA este construită de fapt din deoxipolinucleotide sintetizate pe cale chimică și numai legarea lor se face pe cale enzimatică, sinteza este considerată a fi de natură chimică.

Sinteza de deoxipolinucleotide — unitățile de construcție a pasagerului sau a genelor, în general — se face prin două metode diferite. Prima, preconizată de grupul lui Khorana (Khorana 1968 a, b; Gupta și colab. 1968 a, b, c; Agarwal și colab. 1970), constă în esență în sinteza de di- și trinucleotide, care sînt apoi condensate între ele pentru a obține pentanucleotide. În continuare, condensarea unui pentanucleotid cu un trinucleotid dă naștere unui octanucleotid ș.a.m.d. Prin această metodă s-a ajuns la sinteza unor catene care au conținut 20 de nucleotide (icosa I și icosa II), cu secvența dorită, și ea a stat la baza sintezei totale a genei pentru tRNA<sup>Ala</sup> (Agarwal și colab., 1970).

A doua metodă, mai recentă, folosită de grupul lui Itakura pentru sinteza chimică a genei pentru somatostatina și a genelor pentru insulina umană, se bazează pe sinteza unor trimeri bifuncționali ca blocuri de construcție pentru sinteza oligodeoxiribonucleotidelor cu secvența dorită.

Fundamentală pentru ambele metode este blocarea selectivă a grupărilor funcționale ale nucleotidelor cu grupări protectoare și păstrarea liberă numai a acelor grupări care intră în reacție în momentul dorit. Cele două metode notate cu A și B în fig. 59, diferă între ele prin strategia aleasă pentru sinteza deoxipolinucleotidelor, prin tipul de grupări protectoare folosite, precum și prin agentul de condensare specific întrebuințat (Itakura și Riggs, 1980).



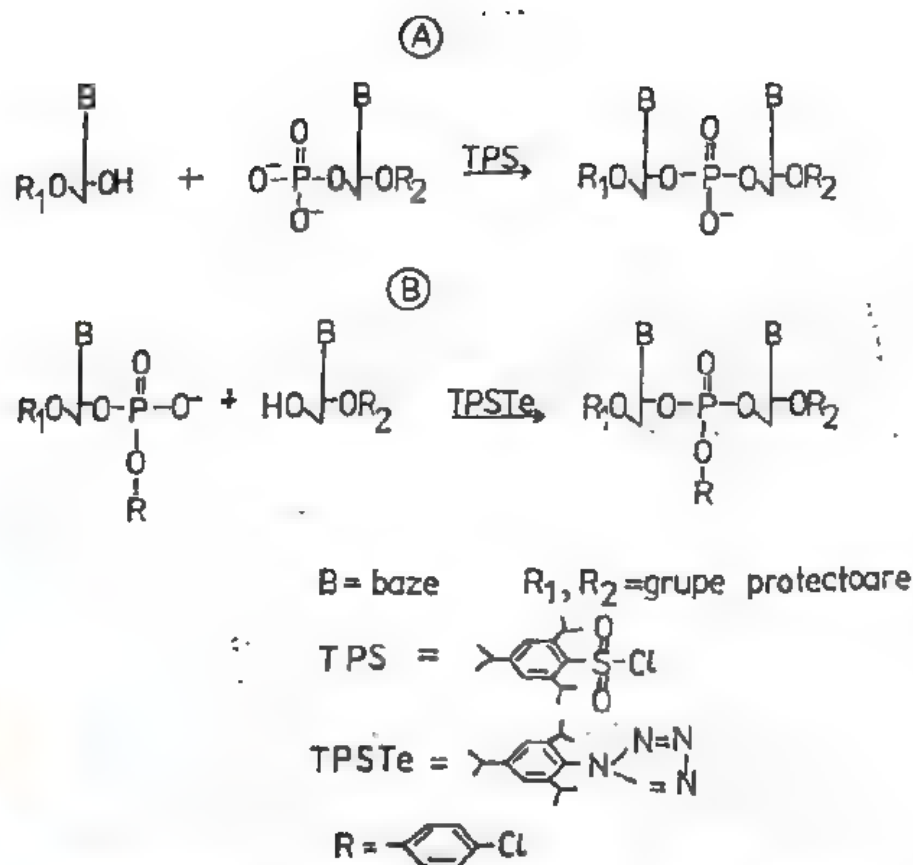


Fig. 59. Cele două metode principale de sinteză chimică a DNA: (A) metoda diesterilor; B) metoda triesterilor (după Itakura și Riggs, 1980).

### VI.3.1. Metoda I-a sau metoda fosfodiesterilor a lui Khorana și colab.\*

Sinteza începe de la capătul 5'-hidroxilat al DNA, iar prima legătură internucleotidică se realizează prin condensarea N-izobutiril-5'-monometoxitritildeoxiguanozinei (dMMTr-G<sup>iBu</sup>) — componenta I din fig. 60 cu 3'-O-acetil-N-benzoiladenozin-5'-fosfat (dpA<sup>Bz</sup>-OAc) — componenta II din fig. 60 în prezența diciohexilcarbodiimidei (DCHCDI) ca agent de condensare.

În etapa următoare se realizează condensarea succesivă dintre blocuri de di-, tri- și mai târziu tetranucleotide la capătul 3'-hidroxilat al catenei crescînde de polinucleotid, avînd toate celelalte grupări funcționale protejate.

Sinteza generală descrisă de Agarwal și colab. (1970) pentru sinteza unui segment de DNA conținînd 20 de nucleotide este următoarea:

\* Denumirea de metodă fosfodiestică derivă de la particularitatea ei de a utiliza pentru sinteza DNA compuși intermediari fosfodiesterici.

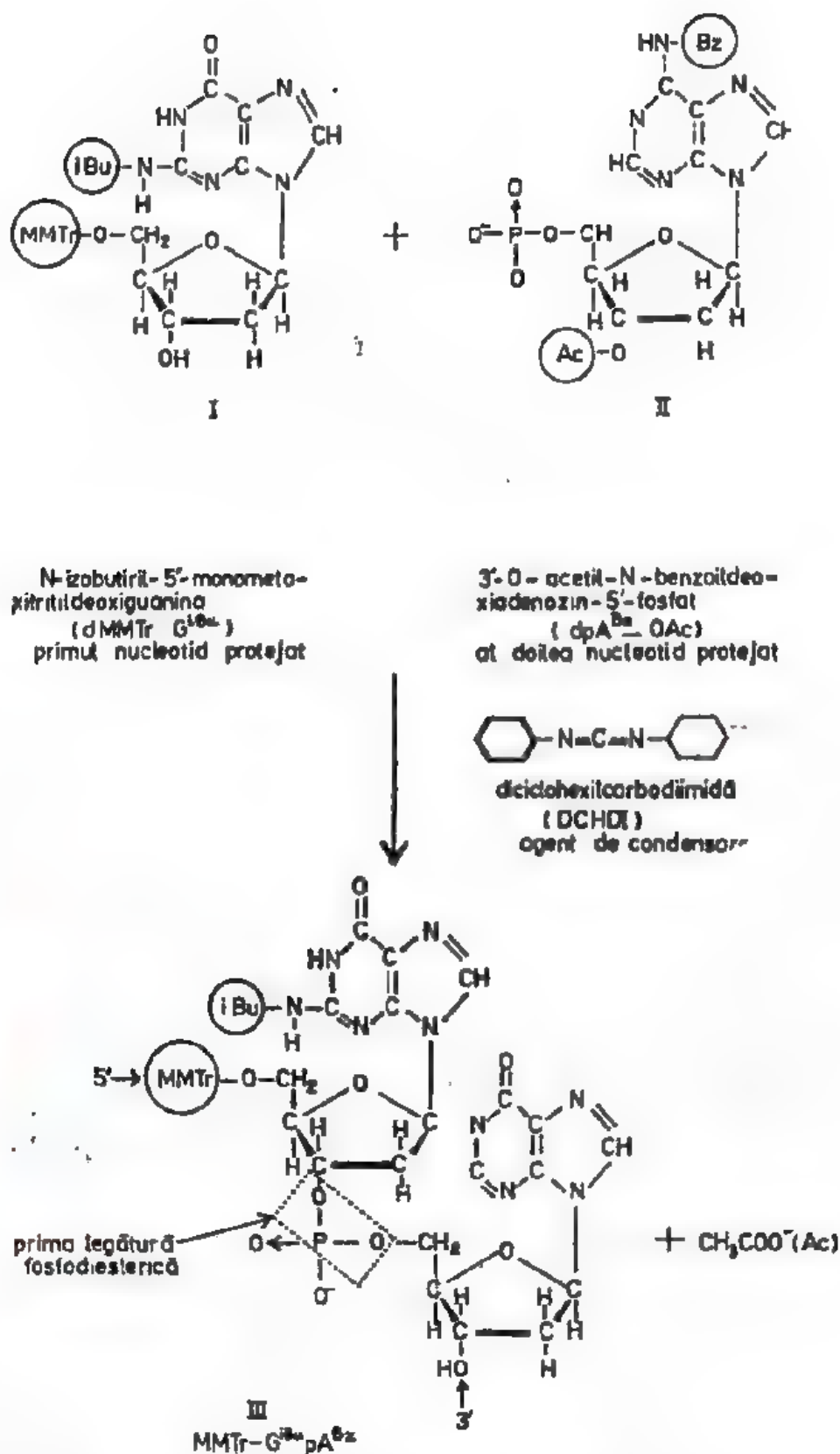


Fig. 60. Sinteza dinucleotidului MMTr-GIBupABz prin metoda preconizată de grupul lui Khorana. Grupările încercuite indică poziția în care s-a făcut protejarea.

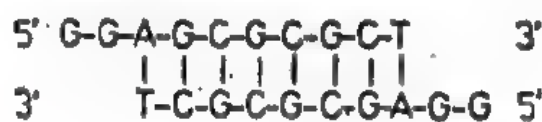




Așezarea literei p în stînga nucleozidului arată gruparea 5'-fosfat, iar în dreapta arată gruparea 3'-fosfat. După cum se observă, gruparea 5'-hidroxil a nucleozidului terminal este protejată cu gruparea monometoxitritil (MMTr), iar gruparea 3'-hidroxil cu acetil (OAc). Grupările funcționale ale bazelor heterociclice sînt protejate astfel: pentru guanină se folosește gruparea izobutiril (iBu), pentru adenină gruparea benzoil (Bz), iar pentru citidină gruparea anisoil (An).

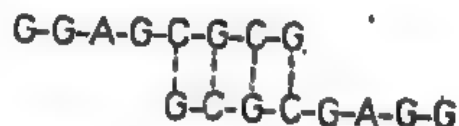
Randamentul de obținere a produsilor scade cu creșterea lungimii catenei, astfel că produșii finali se obțin cu randamente în general mici. Fiecare etapă de condensare este însoțită de purificarea minuțioasă a produsului obținut prin cromatografie pe coloană cu schimbători de ioni anionici. Structura produsilor este analizată prin cromatografie pe hîrtie, atît în forma care conține și grupările protectoare, cît și după îndepărtarea acestora. În faza finală a sintezei fiecărui segment de DNA purificarea s-a făcut cu ajutorul cromatografiei pe DEAE-celuloză în prezența ureei 7 M. Îndepărtarea sărurilor s-a făcut prin trecerea produsului pe coloane de „Bio-Gel”.

Segmentele de DNA astfel obținute sînt monocatenare. Din ele se construiesc molecule bicatenare prin simpla amestecare a segmentelor de DNA construite astfel încît ele să aibă bazele complementare. Unele segmente însă, datorită particularităților secvențelor de nucleotide, sînt auto-complementare și formează ele însele direct structuri bicatenare, cum este cazul următorului decanucleotid:



Cu excepția a cîte două baze de fiecare parte a moleculei rămase neinteracționate prin legături de hidrogen, celelalte opt sînt angajate într-o structură bicatenară.

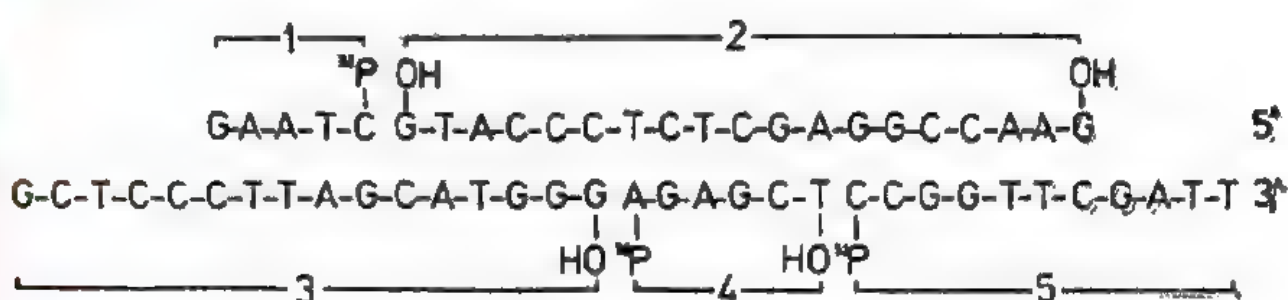
Uneori, formarea acestor segmente este nedorită pentru că împiedică obținerea secvenței dorite. Pentru a preveni sau a reduce auto-complementarea unor segmente se pot utiliza mai multe variante. Una dintre acestea este sinteza unui segment mai scurt și mărirea compensatorie a segmentului adiacent. De exemplu, prin reducerea decanucleotidului prezentat cu două nucleotide (TC), se va obține octanucleotidul cu următoarea structură secundară:



Structura secundară a segmentelor rezultate prin auto-complementaritate poate fi îndepărtată și prin încălzirea soluției lor, tratament în urma căruia legăturile de hidrogen dintre baze se rup.

**VI.3.1.1. Fosforilarea.** Segmentele de DNA sintetizate sînt în etapa următoare legate între ele. În acest scop ele sînt întii fosforilate la capătul 5', folosind polinucleotidkinaza *T4*. Fosforilarea este considerată terminată în momentul în care, după cicluri noi, încălzirea și răcirea produsului și tratarea lui cu kinază proaspătă nu are efect asupra reacției. Separarea segmentelor fosforilate de excesul de ATP marcat în poziția  $\gamma$  ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP) se face prin trecerea amestecului de reacție prin coloane de „Sephadex”.

**VI.3.1.2. Ordonarea și legarea segmentelor de DNA între ele.** Reacțiile de conectare (legare) a diferitelor segmente de DNA se desfășoară în condiții diferite de concentrații de  $\text{Mg}^{2+}$  și temperatură. În cazul particular al formării din 5 segmente de DNA conținînd 5 pînă la 20 nucleotide a unei molecule de DNA avînd 25 de perechi de baze și 9 nucleotide (4 de o parte și 5 de cealaltă parte a moleculei) înălțuite monocatenar, amestecul segmentelor de DNA se face într-o soluție care conține Tris-HCl 15 mM, ditiotritol (DTT) 10 mM, ATP 6  $\mu\text{M}$  și fosfat de sodiu 2,5 mM. Soluția se încălzește la 60°C timp de 30 minute, după care se adaugă  $\text{MgCl}_2$  pentru a avea concentrația de 10 mM. În urma acestui tratament, cele cinci segmente (notate cu 1 pînă la 5) se ordonează astfel încît molecula care rezultă are următoarea structură:



Segmentele interacționează între ele pe baza principiului bazelor complementare, formînd compuși de tip bicatenar avînd discontinuități în catene. Acestea sînt îndepărtate prin incubarea amestecului cu DNA-ligază. Enzima are proprietatea de a induce formarea legăturilor covalente între nucleotidul 5'-fosforilat terminal al unui segment și nucleotidul 3'-hidroxilat terminal al segmentului adiacent. Legarea segmentelor se face în două etape. În prima se ordonează și leagă segmentele 1—4, iar în a doua segmentul 5 se leagă de produsul anterior obținut.

Produsul reacției de legare se separă de componentele neintrate în reacție cu ajutorul coloanelor de „Agaroză” sau „Sephadex” și este analizat prin trei metode diferite:

- 1) rezistența la fosfatază;
- 2) degradarea la 3'-nucleotide, folosind fosfodiesteraza de micrococ și splină;



3) hidroliza cu deoxiribonuclează pancreatică și fosfodiesterază de venin pentru eliberarea 5'-nucleotidelor.

Prođuși de hidroliză sînt analizați atît prin cromatografie pe hîrtie, cît și prin electroforeză la  $pH$  3,5.

Eficiența legării între ele a diferitelor segmente este urmărită și prin măsurarea radioactivității specifice a capetelor fosforilate. În general, fosforilarea capetelor segmentelor care rămîn incluse în interiorul moleculei se face cu  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP avînd o activitate specifică mică, iar fosforilarea capetelor care vor fi folosite pentru a realiza conexiuni cu alte fragmente mari de DNA se marchează cu  $\gamma$ - $^{33}P$ -ATP cu activitate specifică ridicată. De asemenea, în scopul stabilirii proporției în care s-a realizat legarea fragmentelor de DNA, se fosforilează specific capetele lor: un fragment se fosforilează cu  $^{32}P$ , iar al doilea cu  $^{33}P$ . Urmărirea radioactivității specifice permite astfel stabilirea facilă a reacției de legare.

**VI.3.1.3. Prima sinteză chimică a unei gene.** Metodologia descrisă a fost elaborată în perioada anilor 1965—1970 de grupul lui Khorana și a culminat cu prima sinteză chimică totală a genei pentru tRNA<sup>Ala</sup>, publicată în anul 1970 de Agarwal și colab. Autorii s-au fixat asupra sintezei acestei gene pentru că în anul 1965 singurul acid ribonucleic a cărui secvență totală a bazelor era cunoscută era aceea a tRNA<sup>Ala</sup>. Aceasta a permis să se stabilească, în baza corespondențelor codului genetic, structura genei pentru tRNA<sup>Ala</sup>.

Sinteza genei tRNA<sup>Ala</sup> s-a realizat după următorul plan de lucru: gena a fost împărțită în trei părți notate cu literele *A*, *B* și *C* (fig. 61).

Fiecare din aceste părți consta din mai multe segmente sintetizate chimic. Prima parte (*A*) a fost alcătuită din patru segmente (notate cu cifrele 1 pînă la 4 în fig. 61), a doua din 5 segmente (notate cu cifrele 5 pînă la 9 în fig. 61), iar a treia parte din 6 segmente (notate cu numerele 10 pînă la 15 în fig. 61). Din aceste segmente s-au format întîi cele trei părți (*A*, *B* și *C*) ale genei prin metoda descrisă, iar în ultima fază a sintezei cele trei părți ale genei au fost legate între ele pentru a obține gena întreagă. Cum tRNA<sup>Ala</sup> conține 77 de nucleotide, gena care controlează sinteza acestui tRNA conține 77 de perechi de baze.

Sinteza a început cu partea a doua (*B*) a genei. Segmentele 5, 7 și 9 au fost fosforilate la capătul lor 5' cu  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP și legarea segmentelor s-a făcut în următoarea ordine: întîi s-au amestecat segmentele 6—9, iar după ce acestea au interacționat, s-a adăugat în amestecul de reacție segmentul 5. Amestecul de reacție (0,84 ml) a conținut: 1,8 nmoli de segment 6, 2,5 nmoli de segment 8, 2,5 nmoli de segment 7 și 2,5 nmoli de segment 9. Amestecul s-a făcut în tampon Tris—HCl ( $pH$  7,7), 15 mM, DTT 10 mM, ATP 66  $\mu M$  și 2,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Amestecul s-a încălzit la 60°C timp de 3 min, iar apoi s-a adăugat MgCl<sub>2</sub> pentru a obține concentrația finală de 10 mM. Amestecul se păstrează 15 min la 15°C,



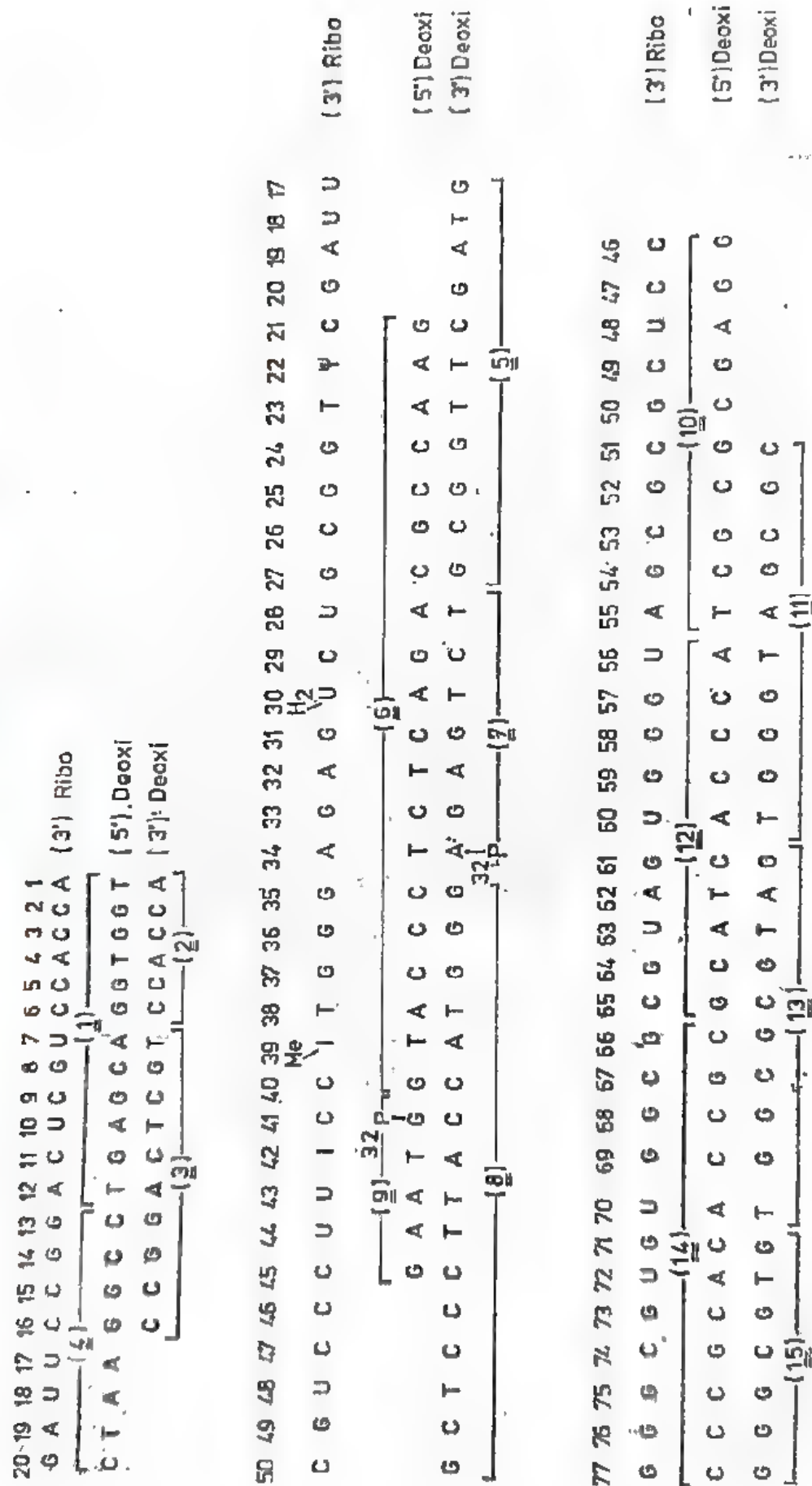


Fig. 61. Planul pentru sinteza genelor tRNA<sup>Ala</sup> (după Agarwal și colab., 1970)

după care se adaugă 250 unități de ligază. După o oră la 15°C, când reacția a atins un platou, amestecul s-a încălzit la 100°C pentru 2 min după care s-a adăugat 3,5 nmoli de segment 5. Preincubarea amestecului timp de 20 min la 25°C urmată de tratarea lui cu 150 unități de DNA-ligază a realizat întâi ordonarea segmentului 5 la restul moleculei și apoi formarea legăturii covalente între ele.

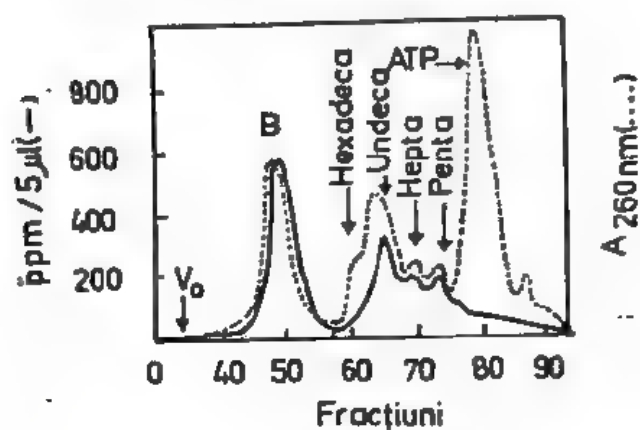


Fig. 62. Purificarea fragmentului *B* pe coloană de agaroză (după Agarwal și colab., 1970).

Fragmentul *B* astfel obținut a fost purificat prin trecerea lui printr-o coloană de „Agaroză” (fig. 62). După purificare, fragmentul a fost analizat și caracterizat prin mai multe metode (tabelul 16). Din examinarea acestui tabel reiese că degradarea enzimatică a fragmentului în 5'-nucleotide dă dpC și dpA în proporție de 2: 1, iar degradarea enzimatică în 3'-nucleotide dă dGp și dTp în proporție de 2: 1. Aceste rezultate sînt în perfectă concordanță cu structura lui *B* prezentată în fig. 62.

Tabelul 16

Caracterizarea fragmentului *B*

Acțiunea fosfatazei	Rezistență 1113 (ppm)		Sensibilitate 0	
Analiza 5'-nucleotidelor ( <sup>32</sup> P pp 5 min)	dpA 747 (1)	dpG 0	dpT 0	dpC 1457 (1,9)
Analiza 3'-nucleotidelor	dAp 0	dGp 12 30(2,1)	dTP 595 (1)	dCp 0

Sinteza fragmentelor *A* și *C* s-a făcut în general după modelul arătat pentru *B*, așa că nu vom descrie detaliile acestei sinteze. Gena întreagă s-a obținut prin două variante. Conform primei variante, *B* a fost legat de *C*, obținîndu-se produsul *B* + *C*, de care s-a legat apoi fragmentul *A*. În a doua variantă, pe care o prezentăm în continuare,

s-a legat întâi  $A$  cu  $B$ , obținându-se produsul  $A + B$ , de care apoi s-a legat fragmentul  $C$ .

**Obținerea fragmentului  $A + B$ .** Urmărirea legării lui  $A$  de  $B$  a fost facilitată de marcarea specifică puternică a lui  $B$  cu  $^{32}\text{P}$  și a lui

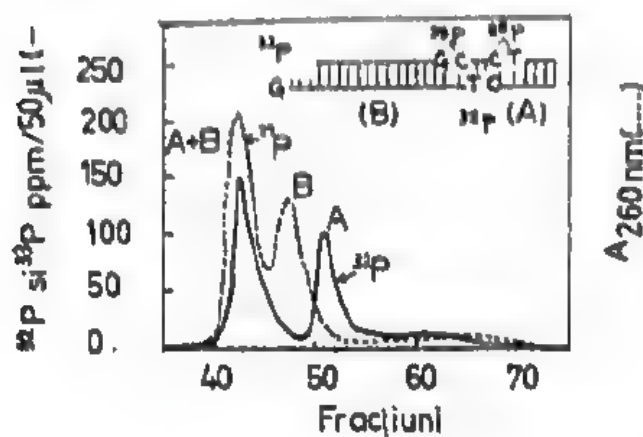


Fig. 63. Sinteza și purificarea lui  $A + B$  (modificat după Agarwal și colab., 1970).

$A$  cu radioactivitate specifică slabă cu  $^{32}\text{P}$ . Randamentul de legare a lui  $A$  cu  $B$  a fost de 60%; detaliile sintezei și purificării sînt date în fig. 63.

**Obținerea genei prin legarea părților  $A + B$  de  $C$ .** Fragmentul  $A + B$  obținut în etapa anterioară a fost cuplat cu fragmentul  $C$  prin intermediul segmentului 10. Condițiile de legare, precum și modul de purificare a genei totale sînt prezentate în fig. 64.

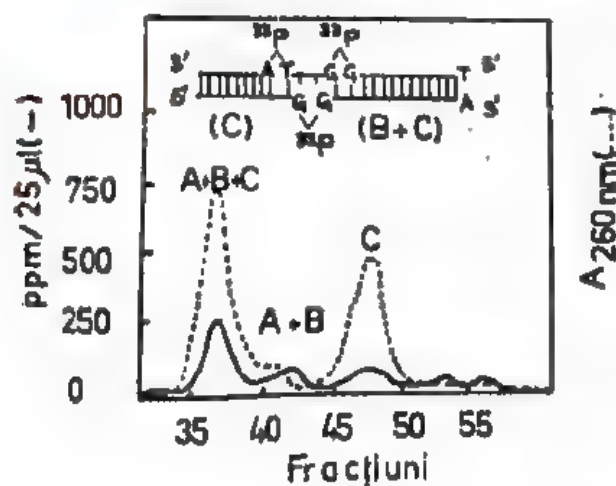


Fig. 64. Sinteza și purificarea genei  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}$  din fragmentele de DNA  $A$ ,  $B$  și  $C$  prin cuplarea compusului  $A + B$  cu  $C$ , prin intermediul segmentului 10.

Primul maxim conține gena totală, al doilea —  $A + B$  neintrat în reacție, iar ultimul — excesul de  $C$ . Testul cu fosfatază, degradarea enzimatică la 5'-nucleotide și la 3'-nucleotide, au arătat că produsul obținut este o moleculă de DNA bicatenară, continuă, conținând 77 de perechi de baze corespunzătoare genei întregi a  $\text{tRNA}^{\text{Ala}}$ .



### VI.3.2. Metoda a II-a sau metoda foslotriesterică a lui Itakura și colab.

În ultimii ani (1977 și 1978) grupul de cercetători condus de Itakura a pus la punct o metodă nouă și rapidă de sinteză chimică a DNA cu secvența bazelor dorită (Itakura și colab., 1977; Crea și colab., 1978; Hirose, Crea și Itakura, 1978). Îmbinarea acestei metode cu procedeele cromatografice noi cu performanțe ridicate, promovate pentru analiza și purificarea fragmentelor de DNA, a avut ca rezultat reducerea substanțială a timpului necesar sintezei moleculelor de DNA. Pentru a scoate în evidență performanțele deosebite ale acestei metode vom menționa că un hexadecadeoxiribonucleotid se poate sintetiza în mai puțin de o săptămână. Or, în cazul metodei anterioare, numai pentru purificarea pe coloană de „Agaroză” a unui astfel de fragment se consumau peste 30 de ore.

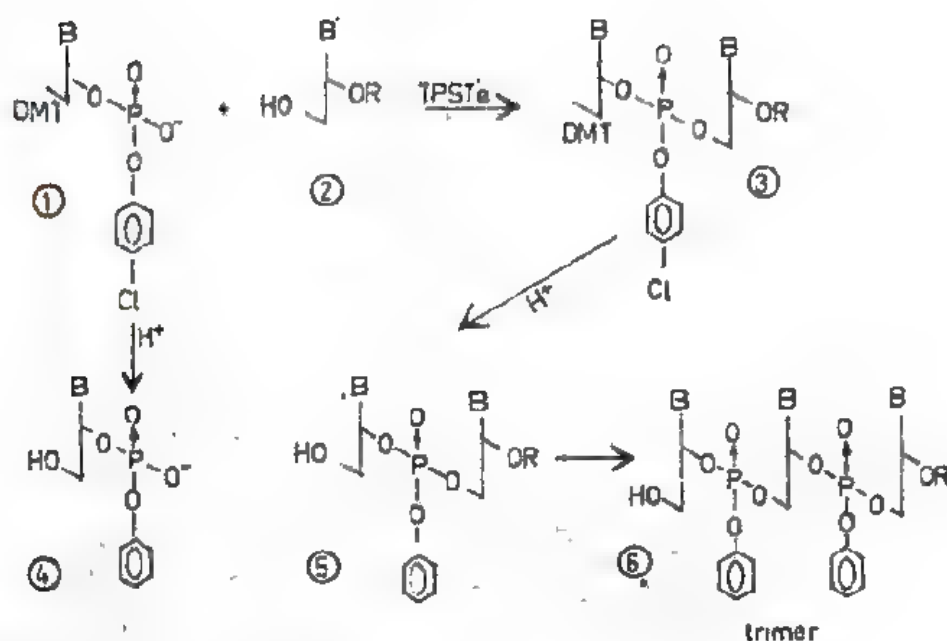
Metoda cuprinde trei momente principale:

- a) sinteza trimerilor cu secvența bazelor prestabilită;
- b) cuplarea trimerilor între ei pentru obținerea de oligonucleotide cu secvența bazelor dorită;
- c) legarea cu DNA ligază a oligonucleotidelor între ele, pentru a obține genele de interes.

**VI.3.2.1. Sinteza trimerilor protejați.** Trimerii sau blocurile de codoni sînt unitățile de bază din care se construiesc oligonucleotidele. Etapele principale ale sintezei unui trimer sînt prezentate în fig. 65. Sinteza începe prin cuplarea 5'-O-dimetoxitritil-3'-*p*-clorofenilfosfatului (compusul 1 din fig. 65) cu a doua nucleotidă care are baza și gruparea fosforică protejată, iar hidroxilul 5' liber (compusul 2), în prezența 2,4,6-triizopropilbenzensulfoniltetrazolidinei (TPSTe) ca agent de cuplare.

În condițiile experimentale arătate în legenda figurii se formează un dimer protejat (compusul 3). Acesta, introdus în mediu acid, pierde gruparea sa dimetoxitritil (DMT) de la poziția 5' terminală și trece în dimerul 5'-OH (compusul 5). Cuplarea tot în prezența TPSTe a dimerului 5'-OH cu 5'-O-dimetoxitritil-3'-*p*-clorofenilfosfat dă naștere la un trimer total protejat.

Într-o lucrare recentă Crea și colab. (1978) precizează că randamentul de sinteză a trimerilor este mai bun dacă sinteza monomerilor total protejați se face din derivați nucleozidici cu un nou agent de fosforilare monofuncțional, care este *p*-clorofenil- $\beta$ -cianoetilfosforoclorură. Acesta, în soluție de acetonitril, în prezența 1-metilimidazolului și a derivatului nucleozidic, determină sinteza mononucleotidului total protejat care este: 5'-O-dimetoxitritil-3'-*p*-clorofenil- $\beta$ -cianoetilfosfatul.



B = bază protejată

DMT = 4,4 - dimetoxitritil

R =  $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OMe}$  sau  $-\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Cl}$

TPSTe = 2,4,6-triizopropilbenzensulfoniltetrazolidă

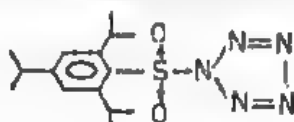


Fig. 65. Sinteza trimerilor. Sinteza începe prin cuplarea compusului 1 cu compusul 2 în prezența puternicului agent de cuplare TPSTe, obținându-se dimerul 3. Prin tratarea amestecului cu acid benzensulfonic 1(2%), [dimerul 3 trece în dimer 5'-OH, 5, prin pierderea grupării 5'-proteceare. Blocul de trimer total protejat s-a preparat din dimerul 5'-OH, 5, și din monomerul 1 în prezența TPSTe.

Prin această metodă se poate sintetiza o mare varietate de trimeri având diferite secvențe ale bazelor. Pentru construirea genelor insulinei, de exemplu, a fost necesară sinteza a 45 de trimeri diferiți.

**VI.3.2.2. Obținerea oligonucleotidelor.** Trimerii obținuți prin metoda prezentată constituie, așa cum s-a arătat anterior, „blocurile de construcție” din care se alcătuiesc oligonucleotidele. La baza sintezei unui oligonucleotid care conține 12 nucleotide, de exemplu (fig. 66), stau două tipuri de trimeri: unul bifuncțional (compusul 1) și un trimer 3'-terminal (compusul 2). Trimerul bifuncțional 1 tratat cu un amestec de piridină: trietilamină: apă (3: 1: 1) este hidrolizat la fosfodiesterul

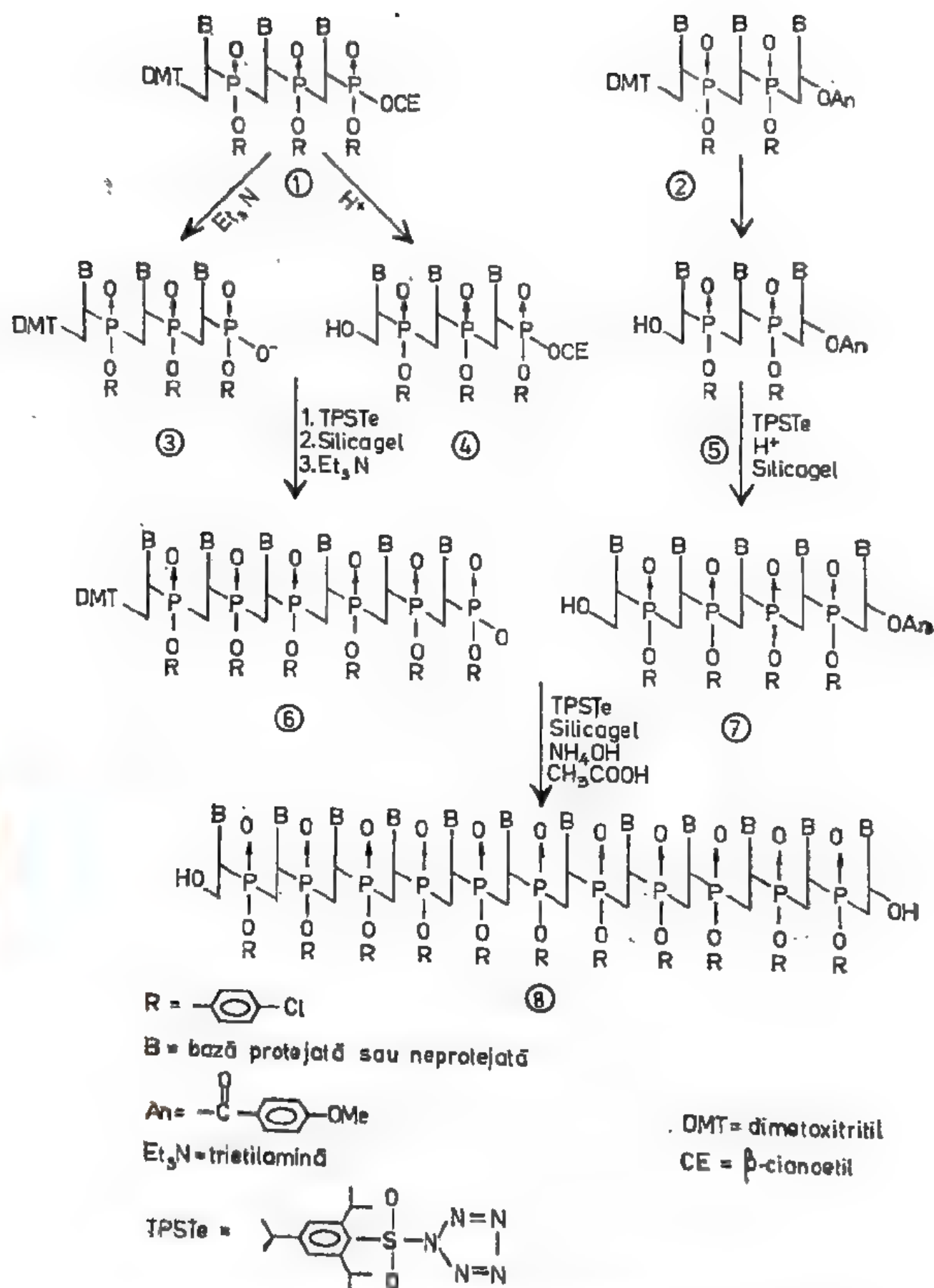


Fig. 66. Sinteza chimică a oligonucleotidelor (după Crea și colab., 1978).



3' (compusul 3), iar acesta pus în contact cu acidul benzensulfonic 2% trece în compusul 4, care are capătul 5' neprotejat.

Trimerul 3'-terminal 2, avînd la capătul 3'-terminal o grupare protectoare anisoil, tratat tot cu acid benzensulfonic 2% pierde gruparea DMT protectoare de la capătul 5', dînd naștere la compusul 5. Gruparea 5'-OH a acestuia, fiind liberă, el poate fi cuplat cu un trimer 3'-fosfodiesteric (compusul 3) în prezența 2,4,6-triizopropilbenzensulfoniltetrazolidinei (TPSTe) pentru a obține hexamerul 7. Trecerea lui 7 peste o coloană de silicagel permite îndepărtarea excesului de trimer 3'-fosfodiesteric 3. Menționăm că pentru obținerea lui 7 compusul 3 este introdus în exces (cantitate echivalentă cu 1,5 M) față de compusul 5 (numai în proporție de 1 M echivalent).

Al doilea hexamer 6, se obține din trimerii 3 și 4 în prezența TPSTe, printr-o strategie asemănătoare utilizată la sinteza hexamerului 7. Și în acest caz îndepărtarea produșilor neîntrași în reacție se face prin trecerea amestecului de reacție pe o coloană de silicagel.

Sinteza dodecanucleotidului 8 se realizează prin cuplarea hexamerului 6 cu hexamerul 7 în prezența TPSTe, iar purificarea lui se face tot prin coloană de silicagel. Pentru a îndepărta grupările protectoare de la capetele 3' și 5' ale dodecanucleotidului acesta este tratat cu  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrat (îndepărtarea DMT) și acid acetic 80% (îndepărtarea An). Purity oligonucleotidelor sintetizate a fost testată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă și analiza bidimensională a secvenței și în general ea este mai mare de 95%.

**VI.3.2.3. Legarea oligonucleotidelor între ele.** Odată ce oligonucleotidele au fost sintetizate ele sînt întii marcate cu  $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$  cu ajutorul polinucleotidkinazei *T4* și apoi legate între ele enzimatic cu ajutorul DNA-ligazei *T4*, în ordinea dorită. Pentru sinteza chimică a genei somatostatinei s-au sintetizat și legat opt oligonucleotide specifice, în timp ce sinteza genelor insulinei umane a necesitat sinteza a 29 de oligonucleotide diferite. Modurile în care s-a sintetizat chimic gena somatostatinei din cele opt oligonucleotide, și în care a fost introdusă această genă într-un vehicul plasmidic sînt descrise în cele ce urmează.

Odată cu apariția metodei triesterilor a lui Itakura, sinteza polinucleotidelor a intrat într-o fază nouă. S-a deschis calea producerii de gene active biologic într-un timp relativ scurt și cu un randament ridicat. Obținerea chimică a genelor, împreună cu tehnologia DNA recombinant oferă astfel posibilitatea de a construi molecule specifice de DNA (pasageri) capabile să dirijeze sinteza unor proteine, hormoni, enzime etc., de mare interes medical și economic.

Progresele în acest domeniu sînt de-a dreptul extraordinare. La începutul anului 1981 (28 ianuarie) agențiile de presă au anunțat realizarea primelor procedee total mecanizate și automatizate de „fabricare a genelor”. Este suficient să oferi unei instalații proiectul genei ca aceasta să-ți livreze gena dorită. Fără îndoială că această realizare va permite o dezvoltare vertiginoasă a ingineriei genetice transformînd radical viața omului.

**VI.3.2.4. Sinteza chimică a genei somatostatinei.** Somatostatina este un hormon peptidic construit din 14 acizi aminați. Ea a fost descoperită de Guillemin în extractele de hipotalamus obținute de la oaie, performanță pentru care autorul a primit Premiul Nobel pentru fiziologie și medicină. Ulterior ea a fost pusă în evidență și în alte țesuturi, precum și la alte specii de animale (Vale și colab., 1976).

Rolul somatostatinei în organismul mamiferelor este acela de a inhiba secreția mai multor hormoni, cum este hormonul de creștere, insulina și glucagonul. Datorită acestei proprietăți, somatostatina este tot mai mult socotită ca un agent terapeutic eficient în tratamentul acromegaliei, al pancreatitei acute și, în special, al diabetului insulino-dependent. Atît izolarea somatostatinei din extractele de hipotalamus sau din alte țesuturi, cît și sinteza ei directă din acizi aminați sînt foarte dificile și costisitoare. Pentru acest motiv prețul ei este foarte ridicat, iar cantitățile care se pot obține pe aceste căi sînt limitate.

Tehnologia DNA recombinant a oferit însă o soluție ingenioasă și avantajoasă pentru producerea somatostatinei. Ea constă în introducerea genei pentru somatostatină, sub formă de pasager, într-o plasmidă adecvată (ca vehicul), care se multiplică și exprimă gena într-o cultură bacteriană.

Dacă alegerea vehiculului adecvat nu ridică probleme speciale, sinteza genei este mult mai dificilă. Progresele realizate însă în ultimii doi ani în ceea ce privește sinteza chimică a genelor au făcut ca accesul către pasager să fie tot mai ușor de realizat. Într-adevăr, lucrările foarte recente ale lui Itakura și colab. (1977) și Crea și colab. (1978) probează din plin valabilitatea acestei afirmații. Autorii menționați au reușit mai întîi să sintetizeze chimic gena pentru somatostatină, iar apoi sinteza — tot chimică — a genelor insulinei. În acest fel s-au pus bazele sintezei chimice rapide a pasagerilor.

Strategia folosită atît pentru sinteza genei somatostatinei, cît și pentru genele insulinei este în general aceeași, motiv pentru care vom descrie numai modul de sinteză a genei somatostatinei. În plus, alegerea somatostatinei ca model a fost determinată și de faptul că gena somatostatinei este foarte mică în comparație cu aceea a insulinei, ceea ce permite urmărirea mai facilă a modului ei de sinteză.



A. *Structura genei somatostatinei*. Analiza chimică a somatostatinei pure a stabilit că ea este un polipeptid mic constituit din numai 14 acizi aminați. Cercetările realizate în anul 1973 de Brazeau și colab. în laboratorul lui Guillemin au reușit să determine secvența acizilor aminați din somatostatină. Odată ce această secvență era cunoscută, structura genei a fost dedusă în baza echivalențelor stabilite de codul genetic.

Deci, structura somatostatinei fiind:

H<sub>2</sub>N-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH

structura genei sale devine:

GCT GGT TGT AAG AAC TTC TTT TGG GAA TCA CTT TCA GCT TGT  
CGA CCA ACA TTC TTG AAG AAA ACC CTT AGT GAA AGT CGA ACA

Trebuie precizat că pentru secvența celor 14 acizi aminați se pot prezice și alte structuri ale genei, codul fiind degenerat (unul și același acid aminat poate fi codificat de mai mulți codoni). Ca atare, secvența aleasă mai sus este oarecum arbitrară. Totuși, alegerea secvenței arătate a fost motivată de mai multe fapte, printre care amintim: a) cercetările anterioare efectuate cu genom de bacteriofag MS<sub>2</sub> au precizat preferința sistemului celular de *E. coli* de a exprima într-un mod specific codoni, mod ce a fost luat în considerare; b) s-a evitat — pe cât a fost posibil — situația de a avea secvențe bogate în AT, deoarece acestea induc de regulă terminarea transcrierii.

B. *Strategia sintezei*. Pentru a obține gena somatostatinei, capabilă de a fi introdusă ca pasager într-un vehicul, era necesar ca planul de lucru să țină seama de următoarele condiții esențiale:

a) să se sintetizeze pe cale chimică oligonucleotide a căror secvență să corespundă cu secvența diferitelor părți ale genei și care prin „sudare” să realizeze unitatea structurală a celor 14 codoni caracteristici genei somatostatinei;

b) oligonucleotidele să fie astfel alese încât să elimine împerecherea nedorită inter- și intramoleculară a nucleotidelor;

c) în scopul facilitării inserției genei în vehicul, capetele 5' să fie monocatenare, iar secvența bazelor de la un capăt 5' să fie identică cu aceea pe care o generează enzima de restricție Eco RI, iar secvența de la al doilea capăt 5' să aibă secvența bazelor identică cu aceea pe care o generează enzima de restricție Bam HI;

d) capătul amino al somatostatinei să fie precedat de un codon pentru metionină, iar capătul —COOH să fie urmat de doi codoni *nonsens*.

Având în vedere cele arătate mai sus, proiectul a prevăzut sinteza genei din opt oligonucleotide diferite. Cele opt oligonucleotide sînt notate în fig. 67, cu literele A—H, iar lungimea lor este cuprinsă între



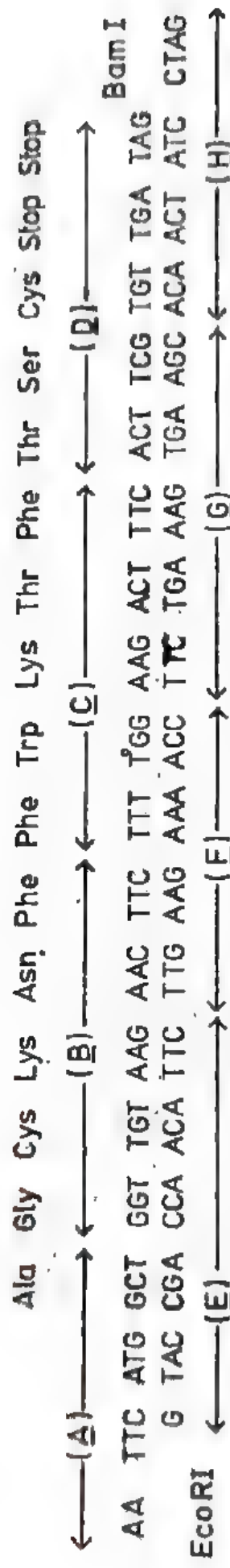


Fig. 67. Sinteza chimică a genei somatostatinei. Rîndul de sus prezintă secvența acizilor aminați din somatostatină. Rîndul al doilea și al treilea prezintă structura genei somatostatinei, dedusă din secvența acizilor aminați. Structura cuprinde în plus față de gena somatostatinei un codon (nucleotidele 6, 7, 8 de la capătul 5' din stînga) pentru metionină, doi codoni nonsens (notați cu „stop” în partea dreaptă a figurii), precum și capetele monocatenare cu secvența nucleotidelor specifică locului de recunoaștere pentru enzimele de restricție Eco RI (capătul 5' din stînga) și Bam HI (capătul 3' din dreapta).

Laterale A—H indică cele opt oligonucleotide sintetizate pentru a construi gena întreagă.

11—16 nucleotide. Aceste oligonucleotide au fost astfel proiectate ca fiecare dintre ele să conțină cel puțin cinci nucleotide complementare cu nucleotidele corespondente din partea interacționată, pentru a asigura un randament bun legării lor de către DNA-ligază. Oligonucleotidele au fost sintetizate chimic prin metoda triesterică prezentată anterior. După sinteză ele au fost marcate cu  $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$  în prezența polinucleotidkinazei și apoi legate între ele cu DNA-ligază din *T4*.

Gena rezultă din autoasamblarea moleculei, datorită formării legăturilor de hidrogen între perechile de baze complementare. Uneori se produce și polimerizarea moleculelor datorită capetelor coezive ale moleculelor. În final, produșii reacției de legare s-au tratat cu enzimele de restricție *Eco RI* și *Bam HI* pentru a genera gena somatostatinei prezentată în fig. 66. Odată terminată sinteza genei, ea poate fi introdusă într-un vehicul pentru a obține un DNA recombinant.

#### VI.4. Pregătirea unor pasageri pentru inserția în vehicul

Enzimele de restricție acționează numai la nivelul anumitor secvențe specifice din moleculele bicatenare de DNA. În tabelul 1 s-a arătat care sînt secvențele recunoscute de principalele enzime de restricție, precum și modul cum se produce scindarea în interiorul secvenței. O serie de enzime de restricție cum sînt *Eco RI*, *Bam I* și *Hind III*, prin scindare, dau naștere la capete coezive, iar altele, cum sînt *Alu I* și *Hae III*, la capete netede. Molecula de DNA fragmentată de aceste enzime de restricție poate fi refăcută, adică capetele fragmentului pot fi legate din nou covalent, dacă sînt incubate în prezența DNA-ligazei *T4*.

Uneori fragmentarea unui DNA se face însă întîmplător, fără intervenția unei enzime de restricție. În acest caz capetele fragmentelor nu au secvențele nucleotidelor cunoscute. Aceeași situație se întîlnește și la moleculele de DNA sintetizate de reverstranscriptază. Pentru ca aceste fragmente sau molecule de DNA să poată fi manipulate cu ușurință în scopul inserției lor în anumite poziții din vehicul — poziții care, în general, au fost create tocmai prin scindarea vehiculului cu o enzimă de restricție — la capetele lor se leagă secvențe de nucleotide specifice, sintetizate chimic. Aceste fragmente conținînd un număr de zece perechi de baze, denumite decameri, au fost astfel sintetizate încît în interiorul lor există situsul de recunoaștere al unei sau mai multor enzime de restricție. În fig. 68 se prezintă structura a trei astfel de decameri sau, cum li se mai spune, *linkeri* sintetizați de Scheller și colab. (1977).

După cum rezultă din figură cei trei decameri, atașați capătului unui fragment sau moleculă de DNA, pot fi utili pentru a crea situsuri de clivare specifice pentru următoarele enzime de restricție: Eco RI, Hpa II, Bam I, Hind III și Alu I.

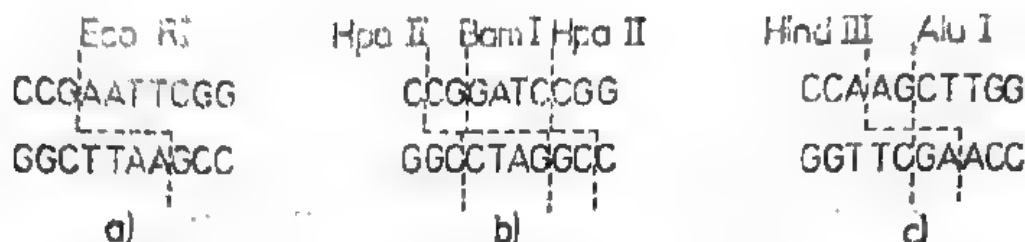


Fig. 68. Structura celor trei decameri (a, b, c) sintetizați de Scheller și colab. (1977) și modul lor de scindare de către enzimele de restricție menționate.

Modul de lucru cu decamerii implică parcurgerea următoarelor etape: a) sinteza chimică a decamerilor prin metoda fosfotriesterilor a lui Itakura (metodă descrisă la sinteza chimică a pasagerilor); b) legarea cîte unui decamer la cele două capete netede ale pasagerului cu ajutorul DNA ligazei *T4*; c) tratarea complexului rezultat cu aceeași enzimă de restricție care va fi folosită și la deschiderea vehiculului, în acest fel formîndu-se la pasager capete coezive, care sînt identice cu

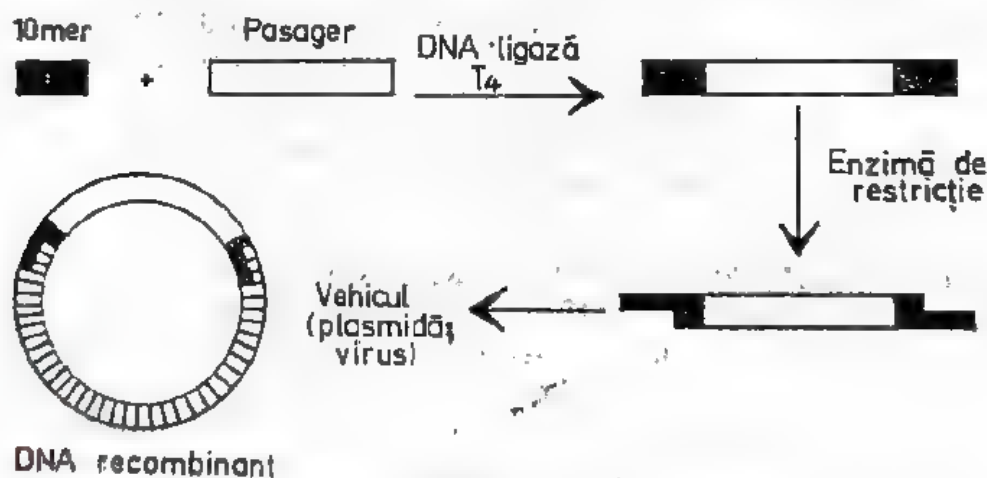


Fig. 69. Prezentarea schematică a utilizării decamerilor sintetizați chimic pentru construirea de DNA recombinant (modificat după Scheller și colab., 1977).

cele ale vehiculului și d) amestecarea pasagerului cu vehiculul „deschis” cu enzima de restricție corespunzătoare. Urmează în continuare procedeele obișnuite de transformare și clonare a celulelor. În fig. 69 sînt prezentate schematic etapele descrise anterior.



## VI.5. Principii generale de exprimare a genelor-pasager

### VI.5.1. Exprimarea genelor eucariote (pasager) în bacterii

Există cel puțin două diferențe principale între semnalele genetice necesare exprimării genelor procariote și eucariote. Prima constă în specificitatea secvențelor care dirijează legarea directă a RNA polimerazei de DNA și inițierea transcrierii sau, cu alte cuvinte, în natura promotorului. Semnalele promotorului eucariot — cu toate că natura lui nu a fost încă descifrată — nu funcționează în bacterii. A doua diferență se situează la nivelul semnalelor care dirijează traducerea mRNA în proteine.

După cum arată Steitz (1979), în cazul mRNA eucariot singura secvență necesară pentru legarea mRNA de ribozomul eucariot și pentru inițierea traducerii este codonul AUG, care codifică metionina de la capătul NH<sub>2</sub>-terminal și care este de fapt primul triplet al mesajului. Alături de acest codon, în unele cazuri s-a semnalat și existența unor modificări posttranscripționale în imediata vecinătate a capătului 5' al transcriptului.

Spre deosebire de această situație, mRNA procariot trebuie să conțină în afară de AUG și secvențele care determină legarea lui eficientă de ribozom, precum și inițierea traducerii (Shine și Dalgarno, 1975). Autorii au arătat că aceste secvențe sînt formate din 3 pînă la 12 perechi de baze situate în regiunea capătului 5' al mRNA care nu este tradus. Mai exact, ele sînt localizate în sensul invers citirii informației, cu 3 pînă la 11 nucleotide înaintea codonului inițiator AUG. Secvențele acestea sînt cunoscute în literatură sub denumirea de secvențe Shine-Dalgarno sau, pe scurt, secvențe SD — după numele descoperitorilor lor. O caracteristică a secvențelor SD este aceea că ele sînt complementare capătului 3' al rRNA 16S. Datorită acestei proprietăți secvențele SD formează un complex duplex cu rRNA 16S, stabilizînd complexul de inițiere format între mRNA și ribozom. Prin urmare, acei RNA care sînt lipsiți de secvențele SD nu sînt eficient traduși de sistemul de traducere al bacteriei.

Ca atare, o genă eucariotă se va exprima eficient și corect într-o celulă bacteriană numai atunci cînd ea va fi transcrisă de un promotor bacterian care posedă secvențele SD în poziția corectă.

Pentru a satisface această condiție, în general se fuzionează fragmentul de DNA care codifică promotorul și transcriptul conducător (*leader*) al unei gene bacteriene cu fragmentul de DNA care conține gena eucariotă. În urma acestei fuziuni rezultă un mRNA care conține secvența SD din gena procariotă și codonul inițiator AUG al genei eucariote.

Guarente, Roberts și Ptashne (1980) au propus ca sursă de promotor și secvență SD un fragment de DNA conținînd o parte din operonul

*lac* și anume promotorul, zona *lac Z* și secvențele SD. Acest fragment se termină cu două perechi de baze înaintea codonului inițiator ATG al zonei *lac Z*. Promotorul poartă o mutație care îl face funcțional în absența proteinei CAP (*catabolite gene action protein*) și adenozinmonofosfatului ciclic necesare stimulării acestui promotor. În plus, fragmentul mai conține și operatorul *lac* locul asupra căruia acționează

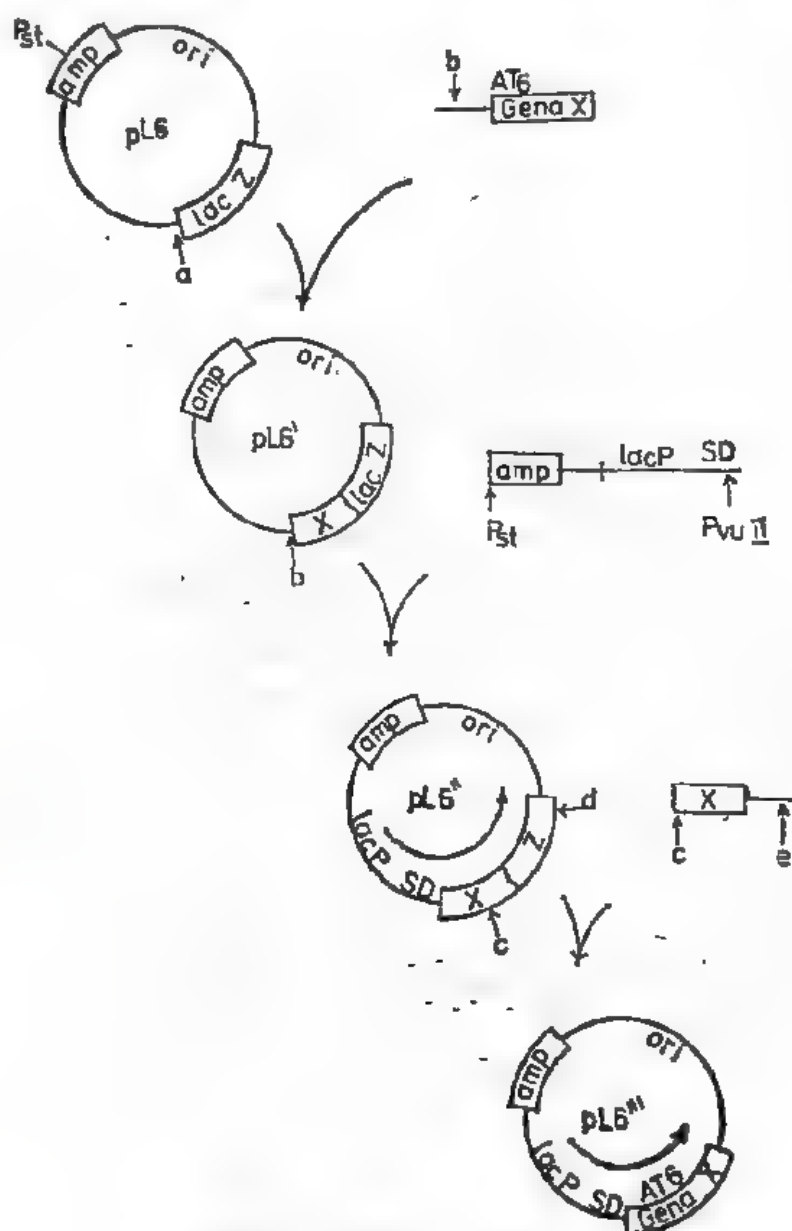


Fig. 70. Metoda generală de optimizare a exprimării unei gene eucariote în *E. coli* (după Guarante, Roberts și Plashne, 1980).

repressorul *lac* pentru a controla promotorul. Pentru acest motiv sinteza proteică este sub controlul promotorului și poate fi reglată de inductori ai operonului *lac* de tipul izopropiltiogalactozidului.

Metoda se bazează pe utilizarea unor plasmide special construite de tipul plasmidei pLG (fig. 70), care poartă o parte din gena *lac Z*

a bacteriei *E. coli*. Fragmentul de genă *lac Z* codifică o mare parte din porțiunea —COOH terminală a  $\beta$ -galactozidazei, activă din punct de vedere enzimatic.

În prima etapă, gena eucariotă X este fuzionată cu plasmida pLG în locul determinat de situsul enzimei de restricție *a*, obținându-se gena fuzionată X'-Z și plasmida pLG.

În a doua etapă, plasmida pLG' este deschisă cu enzima de restricție *b*, iar plasmida liniară rezultată este redusă cu ajutorul unor nucleaze în așa fel ca promotorul *lac* și secvențele SD să ajungă în apropierea codonului ATG care codifică metionina NH<sub>2</sub>-terminală a proteinei X. Trebuie precizat că uneori plasmidele care au promotorul în poziția optimă (cum este plasmida pLG") sînt capabile de a dirija sinteza proteinei fuzionate active enzimatic: proteina X-galactozidază. Această proteină începe cu metionina NH<sub>2</sub>-terminală a proteinei X. Ele sînt recunoscute prin transformarea bacteriilor *lac*<sup>-</sup> în bacterii *lac*<sup>+</sup>.

În ultima etapă, plasmidele producătoare de proteine fuzionate sînt izolate, iar gena eucariotă se reconstituie prin scindarea cu enzime de restricție (*c*, *d* și *e*) care acționează în zona genelor X și *lac Z*.

## VI.5.2. Exprimarea genelor procariote (pasager) în celulele mamiferelor

Introducerea unei gene procariote în genomul unei celule eucariote are o importanță fundamentală, în principal prin perspectiva pe care o oferă pentru vindecarea unor maladii ereditare. Reușita acestei operații depinde atît de cunoașterea modului de organizare a genelor eucariote, cît — mai ales — de lămurirea mecanismelor care intervin în exprimarea lor.

În ultimii ani s-au făcut progrese remarcabile în cunoașterea structurii intime și a modului de organizare a genelor celulelor mamiferelor și a altor organisme eucariote. Astfel, Fritsch și colab. (1980) au reușit să determine secvența nucleotidelor a locusului cromozomal pentru întregul *cluster* de gene responsabile de sinteza  $\beta$ -globulinei. Cum acest locus conține aproximativ 65 Kbp se poate ușor aprecia impresionantul salt realizat în acest domeniu.

Pentru a scoate și mai mult în evidență realizarea grupului condus de Fritsch, se va preciza că stabilirea secvențelor bazelor genomului virusului SV40 care conține 5,3 Kbp, publicată în anul 1978 de Fiers și colab. și independent de Reddy și colab., a fost considerată o mare performanță.

Totuși, în ciuda progresului evident realizat în cunoașterea anatomiei moleculare a unor gene ale organismelor superioare, detaliile modului lor de reglare și exprimare în cursul creșterii și dezvoltării



celulelor mamiferelor, nu sînt încă cunoscute. S-a constatat că nu este suficient să se stabilească structura primară a unei gene pentru a cunoaște modul în care ea se exprimă. De exemplu, din datele de secvență a  $\alpha$  și  $\beta$ -globulinelor nu se poate înțelege de ce primele se exprimă numai în perioada fetală, iar ultimele în aceea a adultului.

Pentru a studia activitatea biologică a genelor în celulele mamiferelor, încă din 1972 s-a făcut uz de virusul SV40 ca vector (Jackson, Symons și Berg). Acesta s-a dovedit a fi un mijloc util pentru caracterizarea stării fizice, pentru exprimarea și reglarea noilor gene în celulele de mamifere.

S-a ales virusul SV40 pentru a media transferul de gene întrucît minicromozomul său se propagă vegetativ se integrează stabil în genoamele celulelor gazdă. Alegerea a fost motivată și de faptul că genele virusului și funcțiile lor au fost identificate, existînd informații intensive despre modul său de replicare, expresie și reglare în diferite celule ale mamiferelor.

În principiu, formarea DNA recombinant din DNA SV40 și gena de interes se realizează prin tehnicile obișnuite de legare a genei de DNA viral întreg sau de segmentele sale subgenomice avînd capete coezive induse enzimatic.

Dar, pentru a realiza un DNA recombinant biologic activ avînd proprietatea de a se replica și exprima în celula gazdă, proiectul obținerii lui trebuie să țină cont de unele particularități ale genomului virusului SV40.

În primul rînd, DNA recombinant trebuie să conțină intactă originea („ori”) replicării DNA SV40. În al doilea rînd, pentru ca încapsidarea în virion să aibă loc este obligatoriu ca molecula de DNA să fie mai mică de 5,3 Kbp, cît reprezintă o lungime de genom matur de SV40.

În al treilea rînd, trebuie ținut seama de faptul că prin excizia unei părți din genomul SV40, DNA recombinant devine defectiv (funcțiile genetice ale părții excizate lipsesc). În consecință el poate fi propagat numai în prezența unui virus ajutător (*helper*) care să-i suplinească produsul (sau produsele) genei (genelor) îndepărtate. Astfel, dacă prin excizie se îndepărtează regiunea tîrzie a genomului, DNA recombinant construit poate fi propagat în prezența unui mutant de SV40 care are regiunea timpurie defectivă. Un astfel de mutant este cel sensibil la temperatura înaltă denumit *tsA*.

DNA recombinanți construiți pe baza principiilor menționate au avut unele neajunsuri și anume s-au replicat numai în celule permissive, ceea ce excludea posibilitatea utilizării lor ca vectori universali în multe celule animale specializate și diferențiate, posibile gazde pentru genele transduse. În plus, există și un alt inconvenient: în cursul infecției DNA recombinant determină moartea celulelor. Ca atare, astfel de DNA

recombinanți nu pot fi utilizați ca vectori pentru exprimarea genelor transduse în celule care se multiplică continuu.

Deci această cale trebuia abandonată, întrucît cu ajutorul ei nu se pot transfera și menține gene în diferite celule. Ea nu are nici o perspectivă de a fi utilizată ca mijloc de terapie genică.

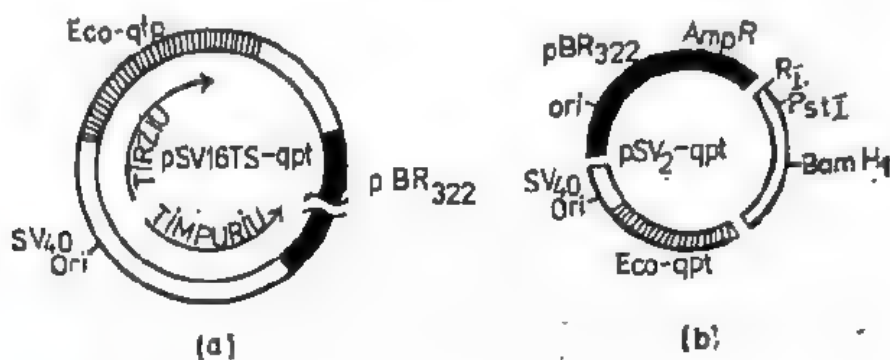


Fig. 71. Principalele caracteristici ale vectorilor *pSV16TS-qpt* (a) și *pSV2-qpt* (b). Zonele nehașurate provin de la genomul virusului SV40 (modificat după Mulligan și Berg, 1980).

În consecință, s-au proiectat și realizat alți vectori care evită în bună parte neajunsurile menționate. Astfel de vectori, cum sînt cei din seria *pSV* (*pSV1*, *pSV2* etc.) construiți de Mulligan și Berg (1980) se pot integra în cromozomul celulei sau pot fi menținuți ca părți componente ale unei molecule de DNA care se replică autonom (fig. 71).

Caracteristicile principale ale noilor vectori sînt următoarele:

- conțin gena *Ecogpt* care codifică enzima xantinguaninfosforiltransferaza (XGPRT) în bacteria *E. coli*. S-a ales gena *Ecogpt* pentru că ea poate fi ușor selecționată. Enzima XGPRT diferă de enzima analoagă din celulele de mamifere și anume hipoxantinguaninfosforiltransferaza (HGPRT) prin aceea că — în sinteza nucleotidelor — xantina este mult mai activă ca substrat decît hipoxantina (Miller, Ramsey și Krenitsky, 1972). Întrucît HGPRT nu utilizează xantina ca substrat, celulele mamiferelor nu convertesc xantina la acid xantilic sau la acid guanilic. De aici rezultă că gena *Ecogpt* poate fi utilizată ca un marker selectiv;

- conțin partea esențială din plasmida *pBR322*. În vectorul *pSV<sub>1</sub>* porțiunea de plasmidă este de 4 Kbp, iar în vectorul *pSV<sub>2</sub>* și *pSV<sub>3</sub>* fragmentul de *pBR322* este de 2,3 Kbp. De menționat că fragmentul de *pBR322* conține în mod obligatoriu originea (*ori*) replicării plasmidei și markerului ampicilinazei (*amp*) de selecție care îi oferă rezistența la ampicilină — gena ampicilinazei (*amp*). Introducerea fragmentului de *pBR322* în vector îi conferă acestuia proprietatea de a se multiplica și în celule bacteriene. Litera *p* situată înaintea denumirii vectorului precizează tocmai această proprietate;



— conțin regiuni ale genomului SV40. Cea mai importantă dintre acestea este regiunea *ori*, responsabilă de originea replicării sale. Datorită ei vectorii se replică și exprimă în diferite celule de mamifere.

#### VI.5.2.1 Transformarea celulelor umane Lesch-Nyhan cu vectorul pSV<sub>2</sub>-gpt

Seegmiller, Rosenbloom și Kelley (1967) au arătat că celulele Lesch-Nyhan sînt lipsite de enzima HGPRT. Pentru acest motiv ele nu pot crește într-un mediu de cultură conținînd hipoxantină (H), aminopterină (A) și timidină (T), deci în mediu HAT. Dacă s-ar introduce însă gena *gpt* cu ajutorul unui vector adevărat ar trebui ca în situația în care vectorul se exprimă corect — aceste celule să poată fi cultivate și pe mediu HAT. Pentru a verifica această posibilitate Mulligan și Berg (1980) au tratat celulele Lesch-Nyhan cu vectorul pSV<sub>2</sub>-gpt. Ei au observat că celulele care nu au primit vectorul nu au supraviețuit în mediu HAT. Totodată, timp de 15 zile nu s-au detectat clone. În schimb, culturile tratate cu pSV<sub>2</sub>-gpt au generat colonii în 7—10 zile. Acestea au fost apoi recoltate și subcultivate după 15 zile. S-au obținut 10 pînă la 20 colonii per 10<sup>5</sup> celule, ceea ce a dat o frecvență de transformare de 10<sup>-4</sup>.

Mai mult chiar, celulele transformate de pSV<sub>2</sub>-gpt testate pentru prezența enzimei bacteriene XGPRT au dat rezultate pozitive, după aproximativ 40 de diviziuni celulare. De aici s-a dedus două concluzii clare și anume:

- gena bacteriană *gpt* introdusă cu ajutorul vectorului pSV<sub>2</sub>-gpt s-a exprimat în celulele umane Lesch-Nyhan;
- transformanții realizați cu vectorul respectiv sînt genetic stabili.

*Perspective:* Așa cum s-a menționat mai sus, exprimarea genelor procariote în celulele mamiferelor are o importanță fundamentală pentru viitoarele încercări de corectare a unor defecte genetice. Odată ce a devenit posibil să se introducă gena *gpt* a bacteriei *E. coli* în celulele umane se poate spune că s-a deschis calea introducerii unor gene procariote diferite în celulele umane. Vectorii nou construiți au suficiente regiuni moleculare care pot fi utilizate pentru a insera în celulele mamiferelor una sau mai multe gene de interes. De exemplu, în regiunea transcrierii tîrzii a segmentului SV40 există situsuri pentru enzimele de restricție Eco RI, Pst I și Bam HI unde se poate opera cu succes în scopul amintit.

### Bibliografie

1. Agarwal, K.L., Buchi, H., Caruthers, M.H., Gupta N.K., Khorana, K., Kumar, A., Ohtzuka, E., Rajbhandary, U.L., Van der Sande, J.H., Sgaramella, V., Weber, H., Yamada, T., *Nature*, 227, 27 (1970).
2. Baltimore, D., *Nature*, (London) 226, 1209 (1970).
3. Baltimore, D., *Bacteriol. Rev.*, 35, 235 (1971b).



4. Baltimore, D., Smaler, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **68**, 1507 (1971).
5. Bolognesi, D.P., Montelaro, R.C., Sullivan, S.J., *Med. Microbiol. Immunol.*, **164**, 97-113 (1977).
6. Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher M., Rivier, J., Guillemin, R., *Science*, **179**, 77 (1973).
7. Coffin, J.M., Temin, H.M., *J. Virol.*, **7**, 625-634 (1971).
8. Crea, R., Kraszewski, A., Hirose, T., Itakura, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 5765 (1978).
9. Dahlberg, J.E., Sawyer, R.C., Taylor J.M., Farasa, J., Levinson, W.E., Goodman, H.M., Bishop, J.M., *J. Virol.*, **10**, 1126- (1974).
10. Delovich, T.L., Davis, B.K., Holme, G., Scon, A.H., *J. Mol. Biol.*, **69**, 373 (1970).
11. Diggelman, H., Faust, C.H., Mach, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **70**, 693 (1973).
12. Englund, P.T., *J. Biol. Chem.*, **246**, 5684 (1971).
13. Fiers, W. et al., *Nature*, **273**, 113 (1978).
14. Fritsch, E.F. et al., *Cell*, **19**, 959 (1980).
15. Guarente, L., Roberts, T.M., Ptashne M., *Science*, **209**, 1428 (1980).
16. Gupta, N.K., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **61**, 215, (1968).
17. Gupta, N.K., Ohtzuka, E., Sgaramella, V., Buchi, V., Kumar, A., Weber, H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **60**, 1338 (1968).
18. Gupta, N.K., Ohtzuka, E., Weber, H., Chang, S.H., Khorana, G. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **60**, 285 (1968).
19. Gurgo, C., Ray, R.K., Thiung, L., Green, M., *Nature*, (London) **229**, 111 (1971).
20. Hurwitz, J., Leis, J.P., *J. Virol.*, **9**, 116 (1972).
21. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
22. Itakura, K., Riggs, A.D., *Science*, **209**, 1401 (1980).
23. Jackson, Symons, *Berg, citati de Mulligan și Berg* (1980).
24. Kacian, D.L., *Nature, New Biol.* **235**, 167 (1972).
25. Kacian, D.L., Watson, K.F., Burny, A., Spiegelman, S., *Biochim. Biophys. Acta* **246**, 365(1971).
26. Chang, C.Y., Temin, H.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **69**, 1550, (1972).
27. Khorana, G.H., *Pure Appl. Chem.*, **17**, 349 (1968).
28. Khorana, G.H., *Proc. VIIth Inter. Cong. Biochim.* Tokyo, 1967, 17 (1968).
29. Manly, K.F., Msoler, D.F., Gromfield, E., Baltimore, D., *Virol.*, **7**, 106-111 (1971).
30. Masamune, Y., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **246**, 2692 (1971).
31. Mc. Donnell, J.P., Garapin, A.C., Levinson W.E., Quintrell N., Fanshier, L., Bishop, J.M., *Nature*, (London) **228**, 433-435 (1970).
32. Miller, R.L., Ramsay, T.H., Krenitsky, G., Elian, B., *Biochemistry*, **11**, 4723 (1972).
33. Mizutani, S., Boettiger, D., Temin, H.M., *Nature*, **228**, 424 (1970).
34. Mizutani, S., Temin, H.M., Kodana, M., Wells R.D., *Nature, New Biol.* **230**, 232-35 (1971).
35. Mölling, K., Bolognesi, D.P., Bauer, H., Busen, N., Plassmann, H.W., Hausen, P., *Nature New Biol.*, **234**, 240 (1971).
36. Mulligan, R.C., Berg, P., *Science*, **209**, 1422 (1980).
37. Palmiter, R.D., Palacios, R., Schimke, R.T., *J. Biol. Chem.*, **247**, 3296 (1972).
38. Reich, E., *Science*, **143**, 684 (1964).
39. Ross, J., Scolnick, E.M., Torado, G.J., Aaronson S.A., *Nature New Biol.*, **231**, 163 (1971).
40. Salser, W.N., *Annu. Rev. Biochem.*, **923**, (1974).
41. Sarkar, P.K., Moscona, A.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **70**, 1667, (1973).
42. Seegmiller, J.E., Rosenbloom, F.M., Kelly, W.H., *Science*, **155**, 1682 (1967).
43. Scheller, R.H., Dickerson, R.E., Boyer, H.W., Riggs, A.D., Itakura, K., *Science*, **196**, 186 (1977).
44. Shine, J., Dalgarno, L., *Nature*, **254**, 34 (1975).
45. Steitz, J.A., in „The ribosomes”, Baltimore University Press p. 479 (1974).

46. Stevens, R.H., Williamson, A.R., *J. Mol. Biol.*, **78**, 505 (1973).
47. Temin, H.M., *Virology*, **20**, 577(1963).
48. Temin, H.M., *Perspective in Biology and Medicine*, **14**, 11 (1970).
49. Temin, H.M., *Annu. Rev. of Genetics*, **8**, 155 (1974).
50. Temin, H.M., Baltimore, D., *Adv. Virus Research*, **17**, 129 (1972).
51. Temin, H.M., Mizutani, S., *Nature*, **226**, 1211 (1970).
52. Ullrich, Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischler, E., Rutter, W.J., Goodman, H.N., *Science*, **196**, 1313 (1977).
53. Vale, W., Ling, N., River, J., Villareal J., Rivier, C., Douglas, C., Brown, M., *Metabolism*, **25**, 1491 (1976).
54. Verma, I.M., Meuth, N.F., Bromfield, E., Manly, K.F., Baltimore, D., *Nature*, (London) **233**, 131 (1971).
55. Verma, I.M., Temple, G.F., Fan, H., Baltimore, D., *Viral Replication and Cancer Proc.*, 2nd. Duron-Reynolds Int. Symp., Barcelona (1973).

## VII. Proprietățile celulelor-gazdă în care se replică DNA recombinant

În momentul în care se hotărăște folosirea tehnologiei DNA recombinant, o primă problemă care apare în fața cercetătorului este alegerea sistemului de celulă gazdă pentru vehiculul modificat. Apare deci inevitabil întrebarea: ce fel de celule pot fi întrebuințate pentru exprimarea și multiplicarea DNA recombinant?

Marea majoritate a cercetărilor cu DNA recombinant se fac, conform normelor de protecție biologică naționale și internaționale, pe culturi bacteriene de *E. coli*, motiv pentru care vom prezenta în principal câteva date despre aceste bacterii.

Totuși, în ultimul timp a apărut și sistemul genetic al *B. subtilis*, cu o a doua alternativă pentru cercetările de tehnologie DNA recombinant și pe care îl vom descrie în finalul acestui capitol.

### VII.1. *Escherichia coli*

Biotipul de *E. coli* existent în natură conține peste o mie de tulpini, cele mai multe dintre ele fiind nepatogene și, colonizînd, în mod obișnuit, intestinul gros al animalelor cu sînge cald. *E. coli* poate fi găsită și în sol, precum și în apă, în special datorită contaminării lor cu fecale. Locul major însă unde se găsește în corp este intestinul gros, unde se stabilizează la o concentrație de  $10^6$ — $10^8$  celule/g de conținut intestinal. Tractul intestinal superior, cuprinzînd stomacul și intestinul subțire, are o floră relativ rară a cărei concentrație este mai mică de  $10^3$  celule/g (Gorbach, 1971).

Există unele tulpini de *E. coli* care sînt enteropatogene, iar altele care produc infecții ale tractului urinar (Curtiss III, 1978). De asemenea, cercetări sistematice au stabilit că un număr relativ mic de tulpini



de *E. coli* pot invada țesuturi sănătoase, însă aceasta se petrece de obicei la indivizi slăbiți în urma unei intervenții chirurgicale, a unui transplant de organ sau a unor boli cum ar fi de exemplu cancerul.

### VI.1.1. Factorii de virulență

Numeroase cercetări au arătat că virulența anumitor bacterii este determinată de structura suprafeței lor. Trebuie precizat însă că patogenitatea nu este determinată de un singur factor, cu toate că antigenele de suprafață pot condiționa la bacterii virulența, rezistența la fagocitoză și colonizarea intestinului (Orskov, 1978). La *Enterobacteriaceae* există două categorii de antigene de suprafață: unele compuse din polizaharide, iar altele din proteine. Cele compuse din polizaharide se divid în două categorii: antigene lipopolizaharidice *O* și antigene polizaharidice *K* capsulare. Lipopolizaharidele (*LPZ*) au trei regiuni: 1) una lipidică (lipida *A*); 2) un miez oligozaharidic și 3) un polizaharid *O* specific. S-a stabilit că lipida *A* este responsabilă de proprietățile toxice ale (*LPZ*) și probabil este similară în diferite *Enterobacteriaceae*. În schimb structura miezului oligozaharidic s-a găsit a fi diferită la *E. coli*. Polizaharidul *O* specific este caracteristic formelor netede de *Enterobacteriaceae*. Acest polizaharid constituie baza chimică a specificității antigenului *O*, iar diferitele antigene *O* sînt condiționate de diferitele componente zaharidice găsite în catena laterală *O* specifică. După cum vom arăta mai departe, mutațiile care afectează sinteza catenei laterale *O* specifice determină obținerea de mutanți rugoși. Întrucît mutanții rugoși sînt mai sensibili față de activitățile bactericide și mai ușor fagocitați, ei sînt mai puțin patogeni și virulenți ca mutanții netezi.

### VII.1.2. *E. coli* K12

Unele tulpini de *E. coli* inițial izolate din fecale sau instalații de canalizare și apoi menținute mai mulți ani în laborator și-au pierdut proprietățile de a coloniza intestinul și de a provoca îmbolnăviri. Dintre acestea cea mai cunoscută și curent folosită în diverse cercetări, inclusiv și cele de tehnologie a DNA recombinant este tulpina de *E. coli* K12. Aceasta a fost izolată în anul 1922 de la un pacient de la spitalul Stanford din S.U.A. Cu toate că ea supraviețuiește pasajului prin tractul intestinal uman sau al altor specii animale, nu s-a observat ca *E. coli* K12 să colonizeze (Anderson, 1975).

Incapacitatea tulpinii *E. coli* K12 de a coloniza intestinul sau de a produce boala se datorește probabil, cel puțin în parte, faptului că *E. coli* K12 este o tulpină rugoasă incapabilă de a produce o lipopoli-

zaharidă (LPZ) normală (conținând catene laterale repetate de antigen O), care se găsește în mod normal în tulpinile netede. În favoarea acestei interpretări pledează faptul că acele mutații care determină trecerea unui antigen patogen din forma netedă în rugoasă are ca rezultat scăderea sau dispariția virulenței sale. Rezultă că incapacitatea tulpinii de *E. coli* K12 de a coloniza celulele poate fi atribuită curenței lor în LPZ, mai ales că o serie de autori au dovedit că LPZ din tulpinile netede au un rol important în colonizarea celulelor de animale și plante.

Pe baza unor studii genetice asupra structurii lipopolizaharidei din *E. coli* K12, Smith (1973) a arătat că fenotipul rugos al acestei tulpini se datorește genei defective *rfb*. Genele *rfb* care sînt legate de genele *his* sînt responsabile de structura catenei laterale a antigenului O. Ulterior s-a precizat că fenotipul neted impune necesitatea ca unitatea catenei laterale a antigenului O să se repete iar această proprietate este controlată de gena *rfc* (Orskov și colab., 1977).

La alte microorganisme enterice gena *rfc* este localizată fie între *gal* și *trp* fie la genele *rfa* (Orskov și colab., 1977). În plus trebuie menționat că genele *rfa* legate între *cysE* și *pryE* loci sînt responsabile de sinteza miezului de LPZ, iar acest miez are o structură particulară neîntîlnită la alte tulpini de *E. coli*. Pentru înțelegerea localizării diferitelor gene prezentăm unele caracteristici ale cromozomului de *E. coli* K12 (fig. 72).

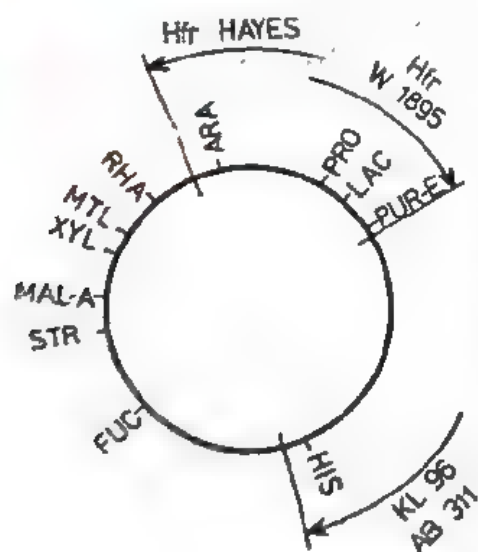


Fig. 72. Cromozomul bacteriei *E. coli* K12. Hfr este gena pentru frecvența înaltă de recombinare; ARA — gena arabinozei; PRO — gena prolinei; LAC — gena lactozei; PUR-E — gena purinei; HIS — gena histidinei; FUC — gena fucozei; STR — gena streptomidinei; MAL-A — gena maltozei; XYL — gena xilozei; MTL — gena manitolului; RHA — gena ramnozei (după Formal și Hornic, 1978).

VII.1.2.1. Proprietățile gazdelor EK1. Tulpinile de *E. coli* K12 denumite EK1 sau B1, care se utilizează curent în cercetările de tehnologie a DNA recombinant cu risc mic, conțin mutații adiționale care nu sînt prezente în tulpina parentală K12. Datorită acestor mutații s-a ajuns la diminuarea și mai accentuată a proprietăților lor de a colo-

niza intestinul animalelor cu sînge cald și de a supraviețui în afara condițiilor artificiale de laborator.

O primă mutație existentă în tulpinile *EK1* este mutația *thy A*, datorită căreia bacteriile cresc numai în prezența timinei sau timidinei. Bacteriile posedînd această mutație au o capacitate redusă de a supraviețui în urma trecerii lor prin intestinul uman sau al șobolanului (Smith, 1975; Curtiss III, 1978).

A doua mutație,  $\beta$ -gal *KTE*, determină creșterea substanțială a capacității de transformare a bacteriei de către DNA plasmidic. Totodată ca o consecință a acestei mutații bacteria trece într-o formă mai rugoasă întrucît mutația provoacă deleția galactozei din miezul *LPZ*.

A treia mutație, *rec A*, induce creșterea sensibilității bacteriilor la lumina solară, în general, și la razele ultraviolet, în special.

A patra mutație, vizează necesitatea prezenței unui sau a mai multor aminoacizi pentru creșterea bacteriilor. Prin introducerea acestei mutații s-a avut în vedere diminuarea suplimentară a capacității de creștere a bacteriilor în afara laboratorului.

**VII.1.2.2. Proprietățile gazdelor *EK2*.** Pentru cercetările cu potențial de risc moderat spre ridicat, normele în vigoare în diferite țări (S.U.A., U.R.S.S., Anglia etc.) privind cercetările de tehnologie a DNA recombinant, impun folosirea gazdelor de tip *EK2*. Acestea au o capacitate mai scăzută de supraviețuire în afara laboratorului decît gazdele de tip *EK1*, deoarece prezintă mutații suplimentare care „mutilează” și mai mult bacteria. În scopul atingerii exigențelor impuse de protecția biologică de tip *EK2*, în diferite laboratoare s-au „construit” tulpini de *E. coli K12* gazde speciale pentru anumite plasmide sau bacteriofagi folosiți curent ca vehicule în tehnologia DNA recombinant (Curtiss și colab., 1977).

O astfel de gazdă este  $\chi$  1776, derivată din *E. coli K12* care poate purta următoarele plasmide: *pBR313*, *pBR322*, avînd determinanți specifici pentru rezistența la ampicilină ( $Ap^r$ ) și tetraciclină ( $Tc^r$ ); *R1drd19*, plasmidă *R* derepresată aparținînd grupului *FII* de incompatibilitate specifică, rezistență la sulfonamidă ( $S^r$ ), streptomycină ( $Str^r$ ), cloramfenicol ( $Cm^r$ ), kanamicină ( $K^r$ ), ampicilină ( $Ap^r$ ); *R64-11*, tot o plasmidă *R* derepresată aparținînd grupului de incompatibilitate *L*, și care specifică rezistența la tetraciclină și streptomycină; *N31* — plasmidă *R* aparținînd grupului de incompatibilitate *N*, și care specifică rezistența la tetraciclină, streptomycină și sulfonamidă. O altă gazdă construită în special pentru multiplicarea bacteriofagului folosit ca vector este tulpina  $\chi$  1953 (DP-50).

Întrucît gazda  $\chi$  1776 este, așa cum am arătat, purtătoare a principalelor plasmide (*pBR313* și *pBR322*) folosite în experiențele de tehnologie a DNA recombinant, vom descrie cîteva dintre caracteristicile ei de bază.



Datorită existenței a două mutații,  $\chi$  1776 are nevoie de prezența acidului diaminopimelic (DAP), un component unic al stratului rigid din peretele celulei bacteriene. În absența DAP, celulele de  $\chi$  1776 lizează. Efectul letal al lipsei de DAP este facilitat și de altă mutație, care împiedică sinteza acidului cholanic, un polizaharid capsular. Acesta este sintetizat de celulele de *E. coli* în condiții speciale de stress și are rolul de a inhiba moartea celulelor cauzată de lipsa DAP.

Mutanții *dap*<sup>-</sup>*K12* nu au capacitatea de supraviețuire în urma trecerii lor prin tractul intestinal. Cantitățile de DAP derivate din distrugerea altor bacterii în tractul intestinal sînt insuficiente pentru a preveni moartea celulelor prin lipsă de DAP. În plus, faptul că organismele eucariote nu sintetizează DAP determină ca mutanții *dap*<sup>-</sup> să nu poată supraviețui în afara condițiilor speciale de laborator.

O altă proprietate esențială a lui  $\chi$  1776 este dependența creșterii sale de prezența timinei sau timidinei, componente indispensabile pentru sinteza DNA. În absența acestei baze pirimidinice se produce degradarea DNA, iar celulele mor.

Tulpina  $\chi$  1776 este de 300 ori mai sensibilă la lumina solară decît tulpinile parentale *K12*, ceea ce o face foarte vulnerabilă la expunerea la lumină. De asemenea, ea nu este dotată cu echipamentul necesar de reparare prin excizie a alterărilor produse de razele ultraviolete în molecula de DNA.

Imposibilitatea supraviețuirii tulpinii  $\chi$  1776 după trecerea ei prin tractul intestinal se datorește și sensibilității ei față de bilă, fapt dovedit prin experiențele efectuate pe șobolani (Curtiss și colab., 1977).

Existența unei constelații de șase mutații în  $\chi$  1776 condiționează structura membranei exterioare, care devine sensibilă atît față de bilă cît și față de o serie de chimicale, detergenți și antibiotice. Astfel, alături de defectul tulpinii *K12* în ceea ce privește sinteza *LPZ*, componentă esențială din peretele celular, tulpina  $\chi$  1776 prin defectele sale adiționale devine și mai sensibilă în mediul înconjurător față de agenții curent utilizați pentru dezinfecție.

S-a constatat și faptul că mutantul  $\chi$  1776 este mai sensibil decît tulpina parentală *K12* față de agenții bactericizi existenți în ser.

**VII.1.2.3. Proprietățile gazdelor EK3.** Conform normelor în vigoare, gazdele de tip *EK3* sînt similare cu cele de tip *EK2*, dar spre deosebire de acestea din urmă ele sînt supuse la teste suplimentare de sensibilitate. După cunoștințele noastre, pînă în prezent, nu s-au avizat încă sisteme bacteriene gazdă-vehicul care să îndeplinească condițiile criteriilor *EK3*.

## VII.2. *Bacillus subtilis*

Această bacterie este un microorganism formator de spori, răspândit în mod natural în sol, de unde a și fost izolat. O serie de cercetători au dovedit că în general el este nepatogen. Totuși în anumite cazuri când gazdele au fost serios compromise, s-au pus în evidență infecții cu *B. subtilis*. Astfel, Farrer (1963) constată trei tipuri de infecții cu bacili nepatogeni: a) infecții locale la nivelul unor organe lezate cum este ochiul; b) infecții mixte în prezența unor organisme patogene și c) infecții diseminate, cauzate în principal de o traumă. La acestea se mai poate adăuga și observația lui Ihde și Armstrong (1973) care constată infecții cu *B. subtilis* în gazde compromise imunologic.

În acest context, *B. subtilis* nu poate fi considerat total nepatogen pentru om. Pentru a-i reduce în mod substanțial persistența se recomandă a se lucra cu mutanți asporogeni, care nu pot supraviețui bine în natură; mutanții asporogeni se autolizează rapid în faza lor staționară de creștere (Brown și Young 1970). Întrucât mulți dintre mutanții asporogeni mai păstrează capacitatea de transformare, ei sînt utilizați în cercetările de inginerie genetică.

Prima transformare a *B. subtilis* a fost realizată de Spizizen (1958) care a reușit „transformarea unor tulpini biochimice deficiente de *B. subtilis* de către deoxiribonucleat”.

Cercetările ulterioare au stabilit condițiile de transformare heteroloagă, adică acea transformare a bacteriei provocată de un DNA extras dintr-o altă specie sau transformarea interspecifică. S-a constatat că frecvența transformării este în general scăzută și că este influențată de doi factori principali: a) analogia bazelor din zona locului de integrare a DNA heterolog și b) prezența situsurilor de restricție nemetilate (Wilson și Young, 1972). Recent, făcîndu-se un bilanț al avantajelor și dezavantajelor pe care le prezintă *B. subtilis* în cercetările de tehnologie a DNA recombinant s-a considerat că are:

a) avantaje: este nepatogen; are o frecvență ridicată de transformare (4%); are o hartă genetică circulară cu 220 loci definiți; posedă vectori bacteriofagi ( $\phi 3T$ ); conține plasmide criptice; permite incorporarea plasmidei *Col E1*; conține situsuri specifice pentru endonucleaze.

b) dezavantaje: vectorii săi potențiali nu au fost suficient de studiați pentru a li se cunoaște harta genetică; plasmidele cunoscute sînt criptice atît la *B. subtilis*, cît și în *B. pumilus*; pînă în prezent nu s-au realizat tulpini de *B. subtilis* care să fie incapabile de a supraviețui în sol (Young, Duncan și Wilson, 1977).

În continuare vom prezenta succint unele probleme privind construcția de DNA recombinanți pentru sistemul *B. subtilis*. O dificultate mare întîlnită aici este faptul că nici una din plasmidele identificate nu posedă trăsături selective (Lovett și Bramucci, 1975), de unde re-

zultă necesitatea construirii de vectori plasmidici sau virali (bacteriofagi) speciali. Un astfel de vector este bacteriofagul  $\phi 3T$ . Acesta este un bacteriofag temperat izolat de Tucker (1969) din sol. Totodată el a arătat că infecția cu acest fag produce prototropie prin conversia lizogenetică a clonelor de *B. subtilis thy*<sup>-</sup>. Fagul conține gena *thy P<sub>3</sub>* care specifică activitatea timidilatsintetazei.

Două grupe de cercetători, Young, Duncan și Wilson (1977) și Ehrlich și colab. (1977) au incorporat gena *thy P<sub>3</sub>* din fagul  $\phi 3T$  în două plasmide diferite; prima, în plasmida *pMB9*, iar a doua, în plasmida *pSC101*, obținând plasmide liniare. În mod surprinzător noua plasmidă denumită *pCD1*, obținută din *pMB9* funcționează atât în *B. subtilis* 168, cât și în *E. coli*, ceea ce va servi fără îndoială la transferul de gene dintre aceste specii prin intermediul ei. Cercetările pentru a realiza vehicule având ca marker selectiv gena *thy P<sub>3</sub>* sînt în curs.

### Bibliografie

1. Anderson, E.S., *Nature*, 255, 502 (1975).
2. Brown, W.C., Young, F.E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 564 (1970).
3. Curtiss, R. III, *The Journal of Infectious Diseases*, 137, 668 (1978).
4. Curtiss, R. III, Pereira, D.A., Hsu, C., Hull, S.C., Clark, J.E., Maturin, L.L., Goldschmidt, R., Moody, R., Inoue, M., Alexander, L., *Recombinant Molecules*, Raven Press, p. 45, (1977).
5. Ehrlich, S.D., Bursztyn-Pettegrew H., Stoynowski I., Lederberg, J., *Recombinant Molecules*, Raven Press, 69 (1977).
6. Farrar, W.E., *Am. J. Med.*, 34, 134 (1963).
7. Formal, S.B., Hornic, R.B., *J. Inf. Diseases*, 137, 641 (1978).
8. Gorbach, S.L., *Gastroenterology*, 60, 1110 (1971).
9. Ihde, D.C., Armstrong, D., *Am. J. Med.*, 55, 839 (1973).
10. Lovett, P.S., Bramucci, M.G., *J. Bacteriol.*, 124, 484 (1975).
11. Orskov, I., Orskov, F., John, B., Jann, B., *Bact. Rev.*, 41, 667 (1977).
12. Orskov, F., *J. Inf. Diseases*, 137, 630 (1978).
13. Smith, H.W., *J. Gen. Microbiol.*, 77, 151 (1973).
14. Smith, H.W., *Nature*, 255, 500 (1975).
15. Spizizen, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.)*, 44, 1072 (1958).
16. Tucker, R.G., *J. Gen. Virol.*, 4, 484 (1969).
17. Young, F.E., Duncan, C., Wilson, G.A., *Recombinant Molecules*, Raven Press, 33, (1977).



## VIII. Metode de identificare a DNA recombinant

### VIII.1. Excizia segmentului de DNA introdus în DNA recombinant

DNA recombinant introdus în celulele receptoare adecvate este multiplicat odată cu multiplicarea celulelor. Prin urmare, gena introdusă artificial în vehicul este și ea replicată odată cu vehiculul de clonare. Se creează în acest fel și posibilitatea de a sintetiza gena respectivă *in vivo*. Dacă însă este nevoie de această genă pentru a o introduce într-un alt vehicul sau într-un alt scop, ea va trebui extrasă din vehicul. În cazul în care inserția genei în vehicul s-a făcut cu ajutorul capetelor coezive de tip poli(dA-dT), Goff și Berg (1978) au descris o metodă ingenioasă pentru excizia ei.

În prima etapă, DNA recombinant este scindat cu o enzimă de restricție care acționează numai în zona moleculei de DNA a vehiculului. Se obține astfel o moleculă lineară conținând gena de interes inserată, flancată de capete de poli(dA-dT). Această moleculă bicatenară este apoi denaturată pentru a se obține o moleculă monocatenară. Datorită existenței secvențelor de poli(dA) și poli(dT) în aceste molecule, printr-o renaturare rapidă ele se circularizează intramolecular lăsând partea de DNA a vehiculului sub forma unor „cozi” (fig. 73). S-au format în acest fel două molecule monocatenare de tip *snaf back*. În continuare cozile monocatenare, constituite din molecula vehiculului, sînt digerate de o enzimă specifică — exonucleaza VII din *E. coli*, iar porțiunea moleculei cuprinsă în interiorul cercurilor rămîne protejată în urma acestui tratament. Incubarea acestei molecule circulare monocatenare de DNA la 88°C în prezența NaCl 1 M determină formarea moleculelor bicatenare de DNA ale genei inserate inițial în vehicul. Ele pot fi purificate prin electroforeză în gel de agaroză și utilizate atît pentru inserția lor într-un nou vehicul (după un prealabil tratament cu o exonuclează adecvată), cît și pentru alte experimente.

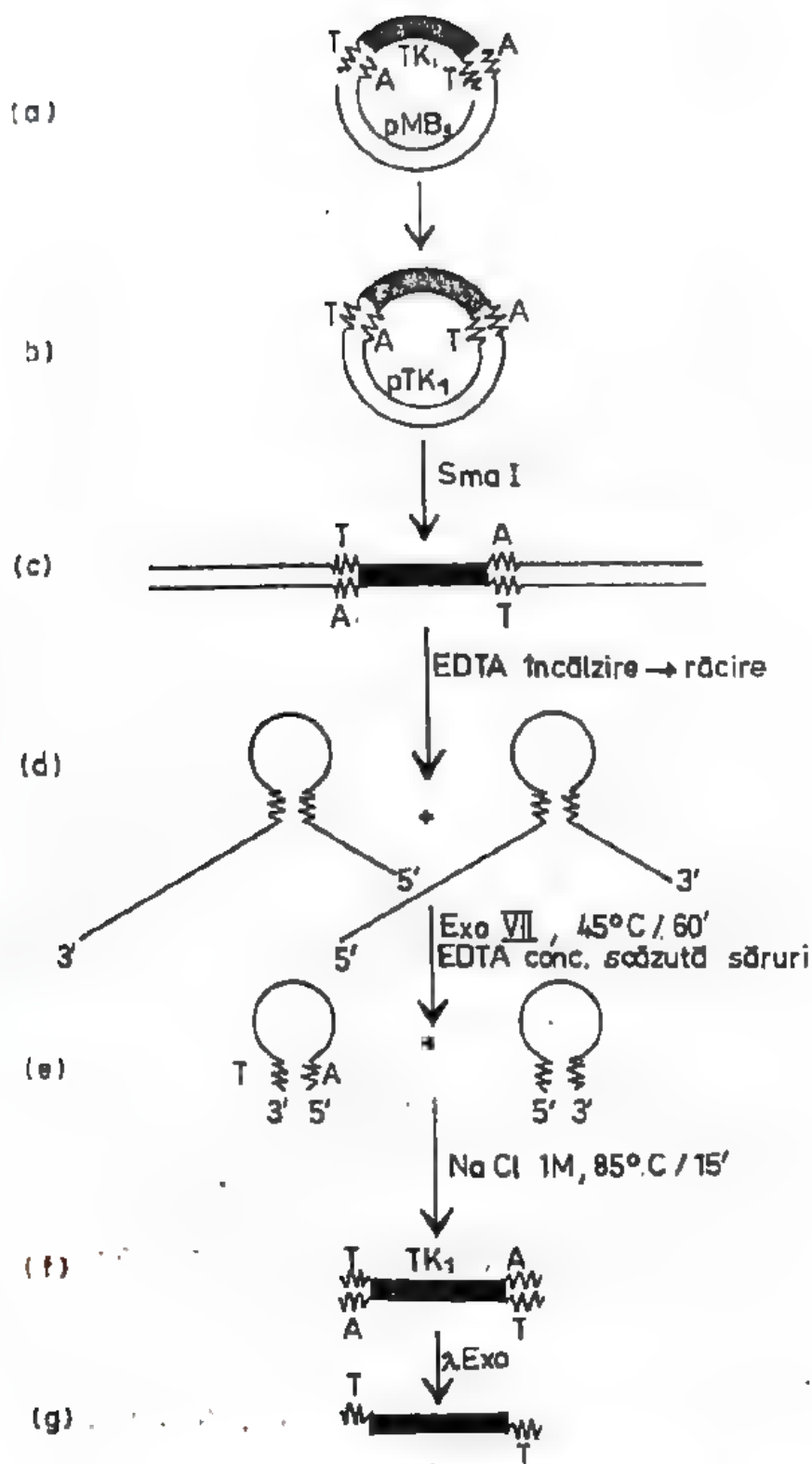


Fig. 73. Schema de excizie a genei timidinkinazei de *E. coli* ( $TK_1$ ), inserată în plasmida  $pMB_9$  (după Goff și Berg, 1978).

## VIII.2. Identificarea directă a DNA recombinant prin testul de hibridizare

Cînd molecula de DNA recombinant nu posedă un fenotip distinctiv, ea poate fi identificată prin hibridizarea întregului DNA, extras din celulele în care se presupune că s-a multiplicat, cu una din componentele care au stat la baza construirii ei.

De exemplu, pentru a identifica un DNA recombinant construit din DNA din virusul SV40 (vehicul) și un fragment de DNA din bacteriofagul  $\lambda$  (pasager), care se multiplică într-o cultură celulară, se procedează în felul următor: fiecare colonie formată este recoltată și cultivată pentru amplificarea materialului celular, iar din cultură se extrage DNA viral. Acesta este apoi hibridizat cu fragmentul de DNA din bacteriofagul  $\lambda$ , care este marcat izotopic și denaturat termic. De menționat că acest fragment este identic cu cel folosit la construcția DNA recombinant. Acel DNA viral care se hibridizează în proporție mare (25—50%) cu fragmentul de DNA denaturat conține fără îndoială DNA recombinant.

Acest procedeu a fost folosit într-o serie de cercetări. Procedeu are însă unele dezavantaje, fiind extrem de laborios, ceea ce permite realizarea unui număr limitat de experiențe. Întrucît în cele mai multe cazuri procesul de transformare are o frecvență foarte scăzută, înseamnă că întrebuițînd acest procedeu există posibilitatea de a pierde tocmai coloniile de interes.

Selecționarea coloniilor de interes purtătoare a DNA recombinant a fost mult simplificată prin testul de hibridizare directă a coloniilor cu acizii nucleici marcați specific.

Coloniile bacteriene, de exemplu, pot fi identificate prin hibridizarea lor direct pe membrane de nitroceluloză cu DNA sau RNA (Grunstein și Hogness, 1975). Procedee asemănătoare au fost descrise ulterior pentru screeningul DNA recombinant construit din fagul  $\lambda$  (Kramer și colab., 1976), precum și pentru detectarea și recuperarea genomului SV40 purtător de DNA străin (Villarreal și Berg, 1977).

Cele trei procedee se bazează pe același principiu, așa că dintre ele vom descrie doar unul, pe cel utilizat în identificarea DNA recombinant construit din DNA SV40. În general, el se poate aplica pentru clonarea oricărui DNA viral infectant care produce plaje sau „foci” în celulele infectante.

Etapele principale sînt: *a*) transferul stratului monocelular și a plajelor sale pe un disc de nitroceluloză; *b*) tratamentul celulelor de pe nitroceluloză cu alcalii, pentru a denatura și imobiliza celulele și DNA viral pe membrană; *c*) hibridizarea celulelor cu un acid nucleic adecvat, puternic marcat radioactiv; *d*) autoradiografia discului de nitrocelu-



loză pentru a identifica plajele care conțin DNA omolog probei de DNA (sau RNA).

Radioautogramele se examinează la diferiți timpi după infecție. În locul în care există radioactivitate apar pete negre pe film, corespunzătoare plajelor în care DNA recombinant s-a multiplicat. Procedeu are și avantajul că permite prin unele artificii recuperarea virusului conținut în plajă.

### VIII.3. Identificarea chimică a pasagerului

#### VIII.3.1. Determinarea secvențelor bazelor sale

Dacă prezența pasagerului în vehicul poate fi dovedită indirect prin apariția în sistemul biologic a proprietăților specifice pasagerului (prezența insulinei, de exemplu, în celulele bacteriene — în cazul în care s-au introdus genele pentru acest hormon sub formă de pasager într-o plasmidă adecvată), dovada directă a prezenței pasagerului fixat covalent de vehicul se poate face doar prin excizie, urmată de analiza lui chimică. Excizia pasagerului poate fi făcută prin metoda specială descrisă de Goff și Berg în 1978. Uneori identificarea se face mai simplu numai prin scindarea cu enzime de restricție a DNA recombinant, urmată de analiza secvenței bazelor fiecărui fragment rezultat pentru a stabili care dintre acestea conține secvența specifică pasagerului.

Dovada directă a prezenței pasagerului în molecula de DNA recombinant se obține deci doar atunci când analiza chimică confirmă că pasagerul scos din vehicul are exact același număr de baze, iar bazele au exact aceeași secvență ca și cele ale pasagerului înainte de a fi introdus în vehicul.

Pînă la publicarea lucrării lui Maxam și Gilbert (1977) determinarea secvenței bazelor din DNA se rezuma practic numai la analiza capetelor moleculelor. Autorii menționați au propus o metodă nouă de determinare a secvențelor bazelor DNA, care, în timpul scurt scurs de la apariția ei și-a făcut din plin dovada calităților sale: ea a fost utilizată cu succes de toate grupele de cercetători care au construit molecule de DNA recombinant pentru a proba identitate pasagerului greșit la vehicul.

**VIII.3.1.1. Principiul metodei.** Un DNA marcat cu  $^{32}\text{P}$  la capătul 5' sau 3' fragmentat specific cu agenți chimici în dreptul adeninei, guaninei, citozinei sau timinei, prin scindarea parțială în dreptul fiecărei baze determină obținerea unui set de fragmente, a căror mărime se extinde de la capătul marcat al moleculei pînă la baza respectivă, ceea ce permite stabilirea exactă a secvenței bazelor.

Considerînd un fragment de DNA care conține 14 baze așezate în ordinea:



dacă scindarea lui parțială se face în dreptul guaninei el va da naștere la următorii șase produși care conțin capătul marcat:

- (1)  $^{32}\text{P}-\text{G}$
- (2)  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}$
- (3)  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{G}$
- (4)  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{G}-\text{G}$
- (5)  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{G}-\text{G}-\text{A}-\text{C}-\text{A}-\text{G}$
- (6)  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{G}-\text{G}-\text{A}-\text{C}-\text{A}-\text{G}-\text{G}$

Aceste fragmente supuse analizei electroforetice în gel de poli-acrilamidă vor migra în ordinea punctului de scindare. Adică, primul (1) spot (bandă) radioactiv va prezenta  $^{32}\text{P}-\text{G}$ , care, fiind cel mai mic produs va avea mobilitatea electroforetică cea mai mare și ca atare se va găsi la capătul de jos al gelului. Al doilea spot (de jos în sus) va conține  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}$  și va avea o mobilitate electroforetică mai mică, al treilea va conține  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{G}$ , și așa mai departe, ultimul fiind deci  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{G}-\text{G}-\text{A}-\text{C}-\text{A}-\text{G}-\text{G}$ , care are mobilitatea cea mai mică. Același fragment de DNA, dacă este scindat parțial în dreptul adeninei, va da naștere la următorii produși marcați:

- (1')  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}$
- (2')  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{G}-\text{G}-\text{A}$
- (3')  $^{32}\text{P}-\text{G}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{C}-\text{G}-\text{G}-\text{A}-\text{C}-\text{A}$

Aceștia, analizați electroforetic, vor avea mobilitatea în concordanță cu mărimea lor; produsul (1') va migra mai puțin decât produsul (2) obținut prin scindarea la guanină, iar produsul (2') mai puțin decât fragmentul (5) de la scindarea la guanină ș.a.m.d. Prin urmare, atunci când scindarea se face în dreptul lui G și A benzile pe autoradiografie vor fi repartizate de jos în sus în ordinea: (1), (2), (1'), (3), (4), (2'), (3'), (5), (6).

În concluzie, conform acestui principiu, autoradiografia unui gel pe care s-a supus migrării electroforetice DNA scindat chimic în dreptul fiecărei baze permite citirea directă a secvenței bazelor.

Metoda este limitată doar de puterea de separare a gelului de poli-acrilamidă. Condițiile experimentale puse la punct de autori permit a se determina secvența a aproximativ 100 de baze de la capătul marcat al DNA. Cum pasagerii utilizați în tehnologia DNA recombinant au în general dimensiunea mai mare decât 100 de baze, pentru analiza sec-

venței lor totale în baze se apelează la enzimele de restricție care îi scindează în fragmente ce pot fi apoi analizate.

Autorii recomandă două strategii diferite pentru analiza secvențelor de baze:

a) DNA bicatenar se fragmentează întâi cu o enzimă de restricție în două porțiuni. Acestea sînt apoi separate pe gel de poliacrilamidă, izolate din gel și, în final, analizate pentru a li se determina secvența;

b) DNA bicatenar se denaturează întâi, apoi se separă cele două catene pe gel, iar fiecare catenă este izolată și analizată în parte.

A doua variantă este preferată pentru că analiza directă (fără denaturare) a DNA bicatenar întîmpină unele dificultăți. De exemplu, reacția de metilare în secvența GGA este inhibată la G-ul din mijloc, iar în secvența AAA reactivitatea lui A este exaltată. Aceste efecte nu sînt prezente cu DNA monocatenar.

### VIII.3.1.2. Scindarea specifică a DNA.

a) *Scindarea la guanină și adenină ( $G > A$ )*. Reacția se bazează pe metilarea în prima etapă a guaninei și a adeninei, urmată de scindarea — în faza a doua — a lanțului polinucleotidic în dreptul bazelor metilate. Agentul de metilare este dimetilsulfatul. Acesta metilează guanina în poziția  $N_7$  și adenina în poziția  $N_3$ . Datorită metilării, legătura glicozidică a bazei metilate devine instabilă și se rupe ușor prin încălzire la pH neutru. În acest fel deoxiriboza rămîne liberă, iar tratamentul cu alcalii (0,1 M) la  $90^\circ\text{C}$  determină ruperea ei de gruparea fosforică învecinată. Fragmentele rezultate în urma acestui tratament efectuat asupra unui DNA marcat la capăt cu  $^{32}\text{P}$ , supuse electroforezei în gel de poliacrilamidă, vor da naștere la o autoradiografie pe care se vor înregistra benzi intense și slabe. Benzile intense derivă de la ruperea catenei în dreptul guaninei (deoarece metilarea guaninei se face de 5 ori mai rapid decît a adeninei), iar benzile slabe de la ruperea catenei în dreptul adeninei, motiv pentru care reacția este notată prescurtat prin  $G > A$ .

b) *Scindarea preferențială la adenină ( $A > G$ )*. S-a constatat că legătura glicozidică a adenozei metilate este mai slabă decît aceea a guanozei metilate. Pentru ruperea ei specifică este nevoie de condiții mai blînde de hidroliză. Ca atare, tratamentul mai blînd cu acizi diluați va elibera adenina, iar hidroliza ulterioară cu alcalii va conduce la ruperea preferențială a legăturii dintre deoxiriboză și gruparea fosforică învecinată. În acest caz, benzile intense de pe autografie vor fi cele ale adeninei, iar cele slabe ale guaninei.

c) *Scindarea la citozină și timidină ( $C + T$ )*. Specificitatea acestei scindări se realizează prin tratarea DNA cu hidrazină. Aceasta reacționează cu citozina și timina și, clivînd baza, formează riboziluree. Hidrazina poate reacționa apoi mai departe, pentru a produce hidrazonă. După o hidrazinoliză parțială la  $20^\circ\text{C}$  (hidrazină apoasă 15—18 M)



a DNA acesta este scindat cu piperidină (0,5 M). Această amină ciclică secundară catalizează  $\beta$ -eliminarea fosfatului, înlocuind toți produșii reacției cu hidrazină. Analiza electroforetică a DNA tratat cu hidrazină arată benzi cu intensitate similară, care provin de la scindarea la citozină și timină.

d) *Scindarea la citozină (C)*. Reacția hidrazinei cu timina este supresată de prezența NaCl 2M. Tratatamentul cu piperidină a DNA astfel tratat produce ruperea lui numai în dreptul citozinei. Deci benzile care se găsesc pe autoradiografie la analiza DNA tratat în condițiile anterioare aparțin citozinei. Acestea, comparate cu cele provocate de scindarea în dreptul citozinei și timinei (C + T), dau prin diferență benzile specifice pentru timină (T).

**VIII.3.1.3. Determinarea secvenței bazelor într-un fragment de DNA.** Pentru a descrie principalele etape ale determinării secvențelor bazelor dintr-un DNA vom lua ca exemplu tocmai pe cel dat de Maxam și Gilbert (1977), care se referă la un fragment de DNA alcătuit din 64 de perechi de baze. Acesta a fost obținut din operonul *lac*, cu ajutorul enzimei de restricție Alu I izolată din *Arthrobacter luteus*, care scindează DNA la secvența AGCT între G și C.

Etapele principale pentru determinarea secvenței bazelor sînt următoarele:

a) *defosforilarea capetelor 5'*. Pentru a marca cu  $^{32}\text{P}$  capetele 5' (sau 3') ale catenelor de DNA ele trebuie în primul rînd defosforilate. Gruparea fosforică terminală se îndepărtează prin incubarea DNA cu fosfatază alcalină;

b) *fosforilarea capetelor 5'*. Fosforilarea capetelor 5' include mai întîi o denaturare termică a DNA în prezența spermidinei, ceea ce crește de cinci ori randamentul fosforilării, iar apoi incubarea produsului denaturat cu  $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$  și polinucleotidkinază, pentru fosforilarea propriu-zisă;

c) *separarea catenelor*. DNA 5'-fosforilat cu  $^{32}\text{P}$  este tratat cu NaOH 0,3 M pentru a-i rupe legăturile de hidrogen, iar apoi este supus electroforezei în gel de poliacrilamidă 8%. Autoradiografia produsului astfel separat arată două benzi: una rapidă și una lentă (fig. 74), care corespund celor două catene de DNA;

d) *extracția catenelor din gel*. Suprapunerea autoradiografiei peste gel permite localizarea benzilor care conțin cele două catene. Regiunea corespunzătoare fiecărei benzi este marcată și apoi excizată din gel. Gelul este omogenizat și transformat într-o pastă, care se tratează cu o soluție de eluție compusă din: acetat de amoniu (0,5 M), acetat de magneziu (0,01 M), dodecil sulfat (0,1%) și etilendiaminotetraacetat (0,1 mM). Amestecul se incubează 10 ore la 37°C și apoi se centrifugează pentru depunerea gelului. Supernatantul conținînd catena eluată se tratează cu alcool pentru a precipita DNA monocatenar;

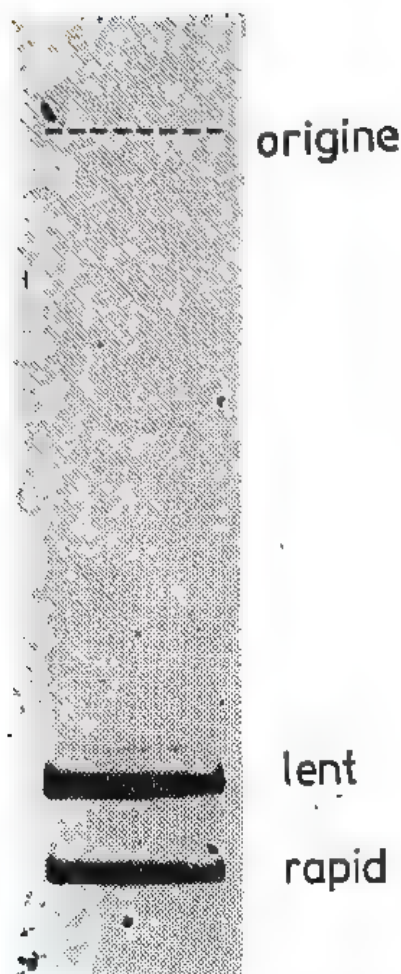


Fig. 74. Separarea electroforetică a catenelor DNA (după Maxam și Gilbert, 1977).

e) *scindarea specifică a catenelor*. DNA monocatenar marcat la capătul 5' cu  $^{32}\text{P}$  izolat din gel este împărțit în patru părți, pentru a se realiza cele patru reacții specifice descrise mai sus ( $G > A$ ,  $A > G$ ,  $C$  și  $C + T$ );

f) *electroforeza DNA scindat specific*. După scindare, fragmentele obținute sînt supuse electroforezei în gel de poliacrilamidă 20% conținînd uree 7 M. Se ia o porțiune din cele patru amestecuri corespunzătoare scindării  $G > A$ ,  $A > G$ ,  $C$  și  $C + T$ , se așează în patru șanțuri diferite și se pornește electroforeza cu 600—1000 V. După 12 ore de la pornirea electroforezei se pune o a doua porțiune din fiecare amestec, în aceleași șanțuri în care s-a pus prima porțiune și se continuă electroforeza. În final, gelul conține două regiuni distincte: una, de sus, corespunzătoare migrării scurte a fragmentelor și una, de jos, care corespunde migrării timp îndelungat a fragmentelor.

Partea de sus conține informațiile pentru partea moleculei apropiată de capătul 5'-marcat, deoarece migrarea scurtă permite separarea numai a fragmentelor mici, iar partea de jos conține informațiile pentru partea mai îndepărtată de capătul 5' al moleculei;

g) *citirea secvenței din rezultatele electroforezei*. În fig. 75 (partea din stînga a fotografiei) sînt prezentate autoradiografiile celor două

regiuni ale aceluiași gel pe care s-a făcut analiza secvenței unei catene. Autoradiografia din stînga, corespunde migrării timp scurt, și arată separarea primei părți a catenei, iar cea din dreapta, care redă rezultatul migrării timp lung, prezintă fragmentele părții a doua a catenei.

În partea dreaptă a figurii sînt prezentate cele două autoradiografii obținute pentru catena a doua de DNA.

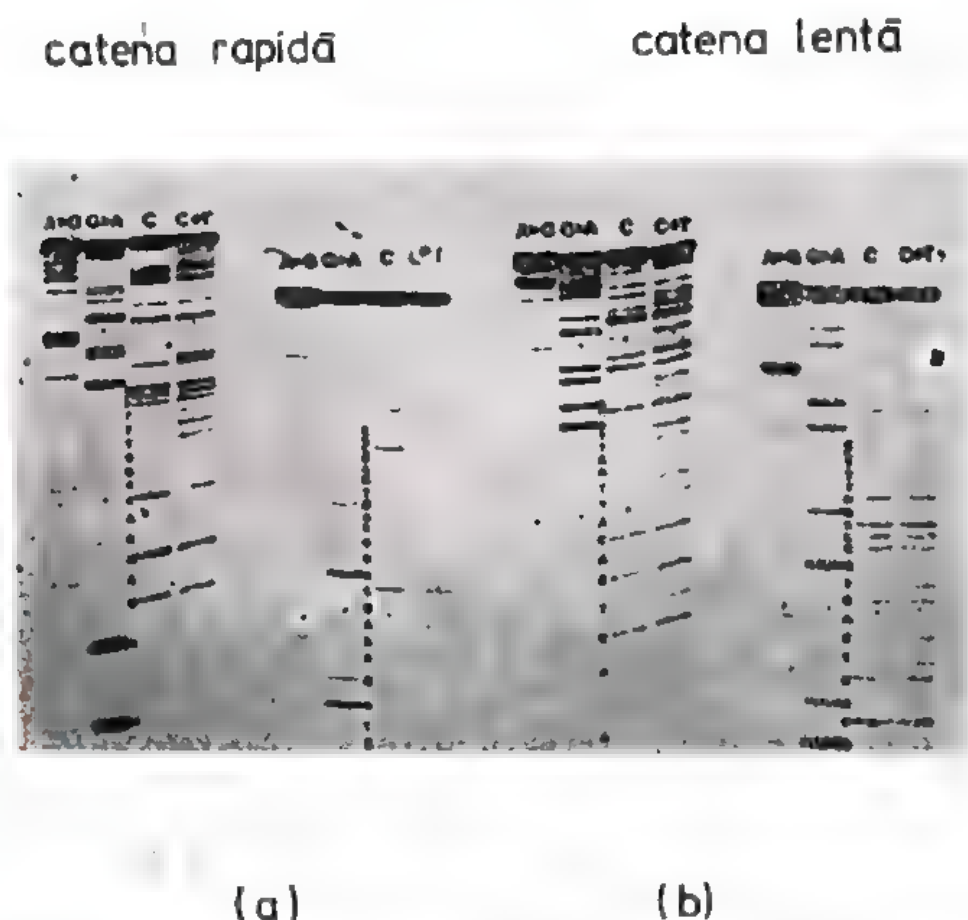


Fig. 75. Principiul metodei de determinare a secvenței bazelor din DNA:  
a) autoradiografia secvențelor de baze din prima catenă de DNA;  
b) autoradiografia secvențelor de baze din catena a doua de DNA.  
Detalii în text (după Maxam și Gilbert, 1977).

Secvența bazelor se citește ușor din distribuția benzilor de jos în sus astfel: prima bandă de jos este în coloana notată  $G > A$  și înseamnă că ea corespunde primei baze situate la capătul 5'-marcat al catenei. A doua bandă se găsește tot în coloana  $G > A$ , ceea ce înseamnă că ea derivă de la ruperea moleculei tot în dreptul guaninei și este deci spotul dat de  $^{32}P-G-G$ . A treia bandă este atât în coloana C, cât și în coloana  $C + T$ , ceea ce înseamnă că ea derivă de la C aflat în poziția a treia de la capătul 5' al catenei. A patra bandă intensă se găsește în coloana întâi ( $A > G$ ). Ea este însă dublată de o bandă slabă situată la același nivel în coloana  $G > A$ . Cu această ocazie trebuie precizat că o bandă intensă în prima coloană ( $A > G$ ) și o bandă slabă în a doua



(G > A) înseamnă un A, iar o bandă intensă în coloana a doua cu una slabă în prima, înseamnă un G.

Prin urmare, în poziția a patra a secvenței este A, în a cincea C ș.a.m.d. Citirea continuă în sus până când benzile pot fi citite clar. Când ele nu se disting clar, se abandonează citirea acestei părți și se continuă pe a doua autoradiografie, pornind tot de jos în sus.

Citirea secvenței bazelor din catena a doua se face în același fel, dar din cele două autoradiografii prezentate în partea din dreapta a fig. 75. Rezultatele prezentate în fig. 75 permit stabilirea secvenței a 62 de baze în fiecare catenă. Celelalte două baze au fost citite dintr-un alt experiment.

Secvența totală a fragmentului de DNA luat ca exemplu, conținând 64 perechi de baze, obținută prin metoda lui Maxam și Gilbert (1977) este deci următoarea:

```

pXXGGCACCAAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCG
GACCGTGGTGTCCAAAGGGCTGACCTTTCGCCCGTCACTCGC
      10          20          30          40

CAACGCAATTAATGTGAGTTAG
GTTGCGTTAATTACACTCAAXXp
      50          60

```

### Bibliografie

1. Goff S.P., Berg P., *Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.)*, 75, 1763 (1978).
2. Grunstein M.G., Hogness P.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.)*, 72, 3961 (1975).
3. Kramer R.A., Cameron J.R., Davis, R.W., *Cell*, 8, 227 (1976).
4. Maxam A.M., Gilbert W., *Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.)*, 74, 560 (1977).
5. Villarreal L.P., Berg P., *Science*, 196, 183 (1977).

## IX. Realizări

Așa cum s-a arătat, tehnologia DNA recombinant a inaugurat era intervenției umane asupra patrimoniului ereditar al organismelor. Sîntem deci în posesia unei tehnologii pe care societatea noastră a început să o folosească pentru progresul ei științific, economic și social. Realizările și perspectivele tehnologiei DNA recombinant pot fi grupate în două categorii principale: una de ordin fundamental și a doua de ordin practic.

Cele de ordin fundamental permit printre altele:

- cunoașterea modului de organizare a genelor în cromozomi;
- stabilirea hărții genetice a unor organisme;
- studiul fizic și chimic al unor gene;
- studiul mecanismului de exprimare și reglare a unor gene;
- stabilirea zonei moleculare a unor DNA virali responsabili de inducerea unor tumori.

Cele de ordin practic constau în:

- obținerea de organisme microbiene noi, capabile de a sintetiza un produs medical sau alimentar de mare interes, prin inserția în genomul microorganismului a genelor specifice;
- posibilitatea obținerii de plante alimentare ameliorate, conținând proteine cu structură apropiată de cea a proteinelor animale;
- posibilitatea obținerii de rase noi de animale;
- posibilitatea transformării celulelor somatice, pentru a corecta defecte genetice cum sînt anemia, fenilcetonuria, diabetul etc.;
- obținerea de plante care cresc în simbioză cu microorganisme fixatoare de azot, eliminîndu-se pe această cale nevoia de îngrășăminte azotoase.

În contextul arătat, domeniile beneficiare sînt numeroase, dintre care medicina, biologia, agricultura, zootehnia sînt poate cele mai ilustrative. Totodată, cu totul peste așteptări, tehnologia DNA recombinant a condus la dezvoltarea unei noi industrii, industria biologică, ce permite mari speranțe, inclusiv în realizarea economiilor și a descoperirii de surse noi energetice.

## IX.1. Construirea DNA recombinant conținând gena somatostatinei

### IX.1.1. Planul general al construirii DNA recombinant

Anterior s-a descris sinteza chimică a genei somatostatinei; în acest capitol vom prezenta construcția unui DNA recombinant conținând gena respectivă ca pasager, precum și modul în care ea s-a exprimat într-un sistem biologic, pentru a controla sinteza unei polipeptide funcționale. Este de fapt vorba de prima sinteză a unui hormon polipeptidic realizată de către o genă produsă în eprubetă, performanță care aparține grupului lui Itakura (v. Itakura și colab., 1977).

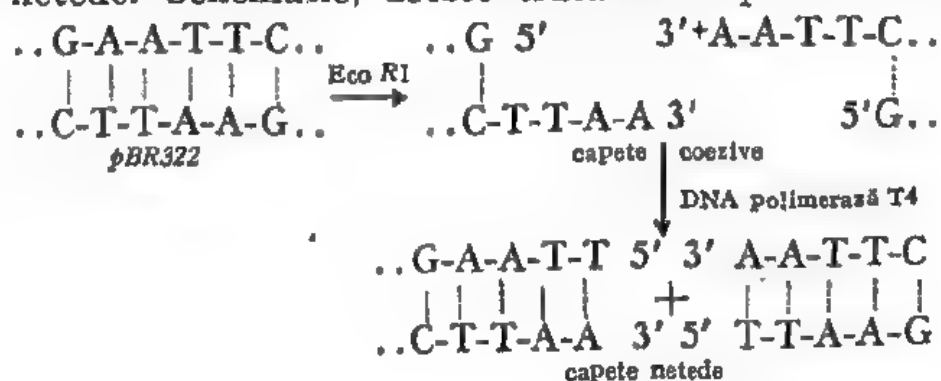
DNA recombinant a fost construit din plasmida *pBR322*, ca vehicul avînd masa moleculară de  $2,6 \times 10^6$  daltoni (Bolivar și colab., 1977), gena somatostatinei ca pasager, și operonul *lac*. Introducerea operonului *lac* s-a făcut în scopul trecerii expresiei informației genetice a genei sintetice a somatostatinei sub controlul elementelor operonului *lac*. S-a ales operonul *lac* și nu un alt operon, deoarece atât structura lui, cît și modul lui de acțiune sînt bine cunoscute (Gilbert și colab., 1975).

Schema generală de construire a DNA recombinant este prezentată în fig. 76.

După cum se va vedea însă mai departe, sinteza acestui DNA recombinant, care este de fapt o plasmidă himerică, este destul de complicată, iar schema din figură redă doar o imagine globală a planului de lucru. Înțelegerea modului de lucru nu poate fi însă realizată fără o descriere detaliată a numeroaselor etape parcurse. De aceea vom reda chiar fiecare artificiu experimental introdus, pentru a cunoaște modul în care s-a obținut primul DNA recombinant conținând o genă de origine chimică care, așa cum am arătat, a reușit să controleze sinteza unui hormon.

#### IX.1.1.1. Etapele construirii DNA recombinant.

a) *Construirea plasmidei pBH10*. Digestia plasmidei *pBR322* cu enzima de restricție *Eco RI* determină deschiderea moleculei sale circulare de tip *CCI* și conversia ei într-o conformație moleculară liniară. Cele două capete monocatenare [coezive, generate de *Eco RI*, sînt apoi reparate de către DNA polimeraza T4, astfel ca ele să devină bicațenare și netede. Schematic, aceste tratamente pot fi redade astfel:





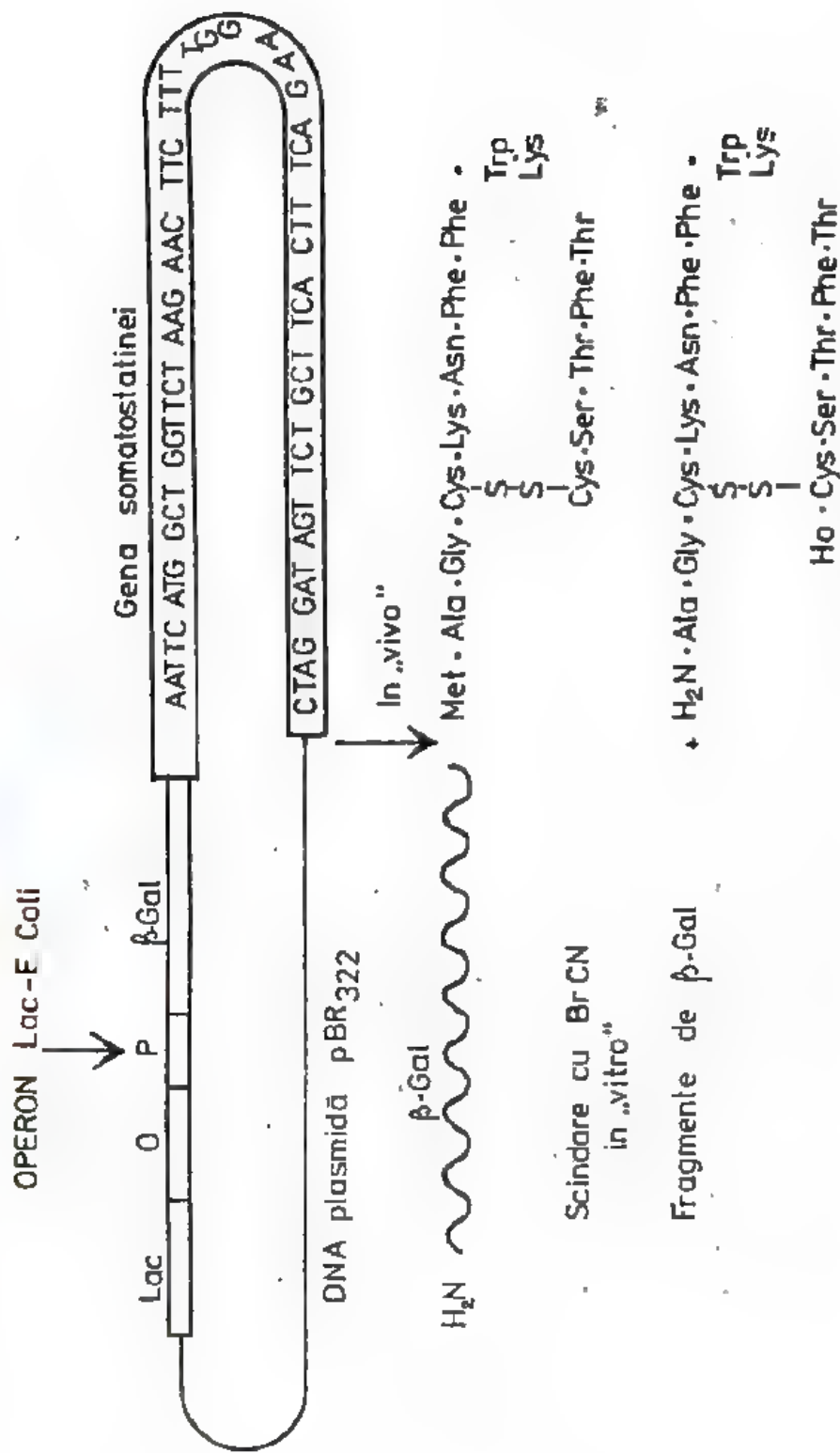


Fig. 76. Construcția plasmidei conținând gena somatostatinei sintetizată chimic. Gena somatostatinei a fost sudată de elementele operonului *lac* și introdusă în plasmida pBR322. Plasmida himeră astfel obținută, denumită pSOMII-3 induce în celulele de *E. coli* sinteza unei proteine himere care, clivată *in vitro* cu BrCN (la nivelul metioninei), eliberează hormonul peptidic activ — somatostatina (după Itakura și colab., 1977).

În continuare, capetele netede sînt legate de fragmentul Hae III cu ajutorul DNA-ligazei din *T4*. Datorită acestei inserții, cele două capete netede, care datorită DNA polimerazei au devenit de fapt două situsuri de recunoaștere pentru Eco RI, ajung să fie distanțate între ele de regiunea fragmentului Hae III. Aceste modificări aduse plasmidei *pBR322* afectează deci atât structura ei (devenind mai mare  $2,74 \times 10^6$  daltoni), cît și funcția ei biologică (fiind înzestrată cu funcțiile elementelor operonului *lac*). Noua plasmidă rezultată a fost denumită *pBH10*.

Etapele construcției plasmidei *pBH10* sînt prezentate schematic în fig. 77. Cu plasmida *pBH10* astfel construită s-a indus apoi transformarea bacteriei *E. coli*, tulpina *RR<sub>1</sub>* (Bolivar și colab., 1977). Transformanții rezultați au fost apoi selecționați pentru markerii Tc<sup>r</sup> și Ap<sup>r</sup>, pe un mediu minimal descris de Miller (1972). Selecționarea coloniilor este facilitată de faptul că plasmida *pBH10* conține gena  $\beta$ -galactozidazei; coloniile sale devin colorate în albastru datorită sintezei  $\beta$ -galactozidazei.

Într-adevăr, screeningul a 45 de colonii izolate a condus la găsirea a trei colonii care conțineau plasmida *pBH10*, avînd două situsuri pentru Eco RI, separate de o regiune cu aproximativ 200 de perechi de baze. Or, fragmentul Hae III inserat în plasmida *pBR322* are tocmai 203 perechi de baze!

Mai mult chiar, analizele au arătat că inserția fragmentului s-a realizat în ordinea dorită, adică transcrierea operonului *lac* se petrece în gena Tc<sup>r</sup> a plasmidei.

b) *Construirea plasmidei pBH20*. Din plasmida *pBH10* s-a construit apoi o nouă plasmidă denumită *pBH20*. Diferența principală între cele două plasmide constă în faptul că plasmida *pBH20* conține numai un singur situs pentru Eco RI, al doilea fiind eliminat. În acest scop plasmida *pBH10* s-a hidrolizat parțial cu Eco RI, astfel că numai unul din situsurile sale să fie atacat de enzimă. Totodată, protecția situsului al doilea pe care acționează Eco RI și care se găsește lîngă gena Tc<sup>r</sup> este asigurată și de tratamentul plasmidei cu DNA-polimerază.

În aceste condiții molecula se deschide numai la situsul pentru Eco RI de lîngă gena Ap<sup>r</sup>. Capetele monocatenare coezive rezultate au fost apoi eliminate prin incubarea plasmidei cu exonuclează *S<sub>1</sub>* care are proprietatea de a acționa numai asupra DNA monocatenar. În urma activității exonucleazei *S<sub>1</sub>* capetele moleculei liniare a plasmidei devin netede; în faza următoare, acestea sînt sudate între ele cu ajutorul DNA-ligazei *T4*.

c) *Construcția plasmidei pSomI*. Plasmida *pBH20* a fost întîi tratată cu Eco RI și Bam I. În acest fel s-au obținut două fragmente moleculare: unul mare și unul mic, ambele avînd un capăt specific enzimei Eco RI și celălalt specific enzimei Bam I. Fragmentul mare s-a purificat și reținut, iar cel mic s-a îndepărtat. După purificare el a fost tratat cu fosfatază alcalină și apoi sudat cu ajutorul DNA-ligazei *T4* de gena somatostatinei sintetizată chimic. În urma modificărilor aduse plasmidei

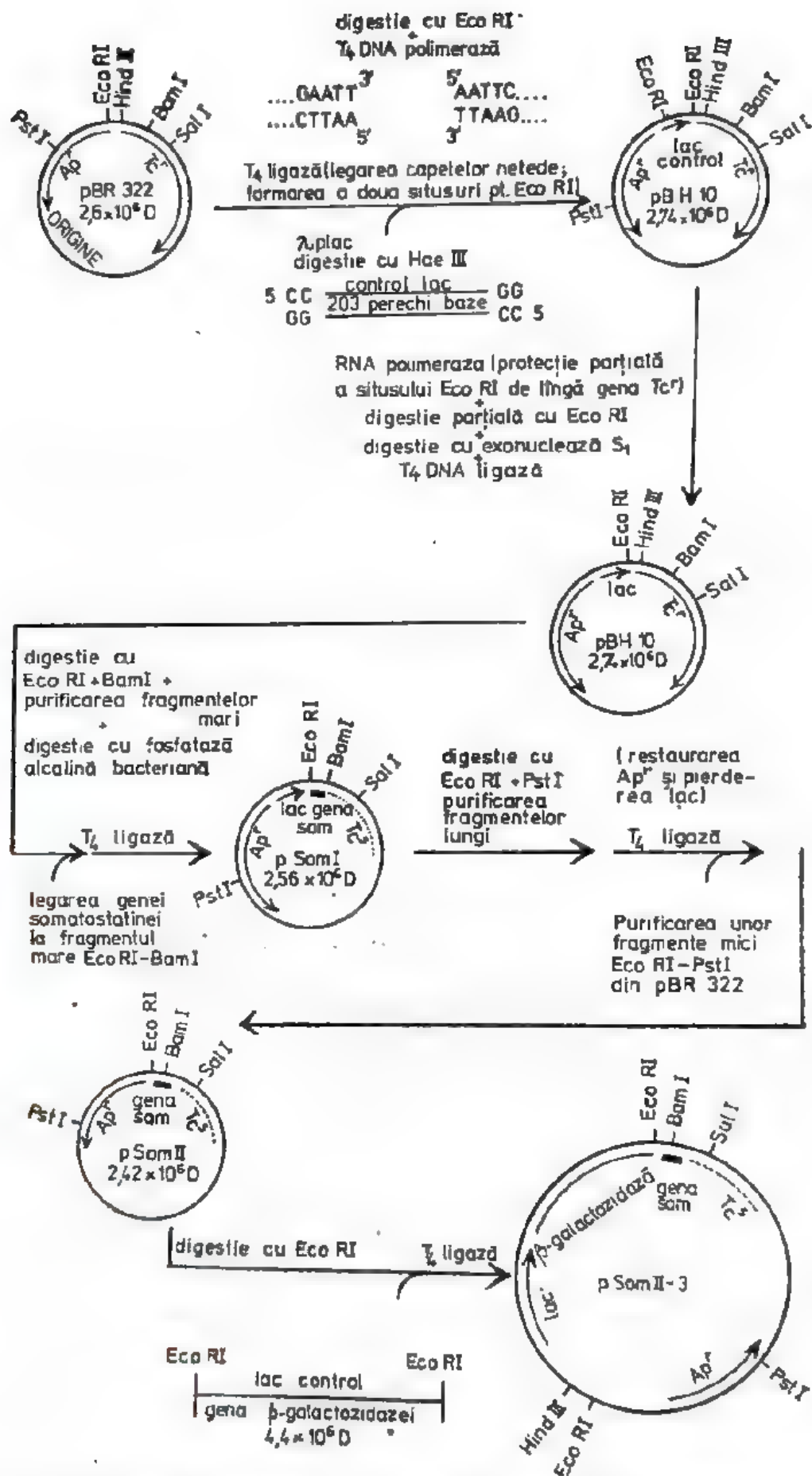


Fig. 77. Schema generală de construire a DNA recombinant conținând gena somatostatinei (după Itakura și colab., 1977).



*pBH20* a rezultat plasmida *pSomI*. Paralel cu acest tratament s-a efectuat și unul de control, în care fragmentul mare al plasmidei *pBH20*, obținut în urma acțiunii celor trei enzime (*Eco RI*, *Bam I* și fosfatază alcalină), a fost legat și circularizat în absența genei somatostatinei.

Ambele plasmide au fost apoi folosite pentru a transforma bacteria *E. coli RR<sub>1</sub>*, iar transformanții au fost selecționați pe mediu cu indicator *X-gal*. S-au izolat 10 transformanți care prezentau sensibilitate la tetraciclină (*Tc<sup>r</sup>*), iar aceștia au provenit de la plasmida *pSomI*, proba de control negenerând nici un transformant. Mai mult chiar, analiza secvenței bazelor fragmentului mic generat de *Eco RI* și *Bam I* a corespuns întocmai cu secvența genei somatostatinei. În acest fel s-a dovedit că gena somatostatinei a fost într-adevăr inserată în locul dorit din plasmidă. Cu toate acestea, în cultura celulară posedând plasmida *pSomI* nu s-a putut pune în evidență somatostatina activă.

d) *Construirea plasmidei pSomII*. Insuccesul exprimării genei somatostatinei inserată în plasmida *pSomI* a fost atribuit proastei localizări a genei în plasmidă. Pentru a verifica această ipoteză, dar mai ales pentru a obține exprimarea genei, s-a construit o plasmidă nouă în care gena somatostatinei a fost așezată la capătul terminal -COOH al genei  $\beta$ -galactozidazei. În acest scop, plasmida *pSomI* s-a hidrolizat cu *Eco RI* și *Pst I*. Fragmentele astfel obținute, denumite fragmente *Eco RI*—*Pst I*, au fost separate pe gel de poliacrilamidă 5%, obținându-se un fragment mare care poartă gena somatostatinei și un fragment mic conținând elementele operonului *lac*. Aceleași tratamente au fost aplicate și plasmidei originale *pBR322*. Fragmentul *Pst I*-*Eco RI* obținut de la plasmida *pBR322* a fost apoi cuplat cu fragmentul *Pst I*-*Eco RI* de la plasmida *pSomI*. Plasmida rezultată, denumită *pSomII*, a fost folosită pentru a transforma celulele de *E. coli RR<sub>1</sub>*. Transformanții obținuți au fost selecționați pentru *Ap<sup>r</sup>* pe un mediu *X-gal*. S-a constatat că 45% din transformanți au dat naștere la colonii albe pe plăci indicatoare *X-gal*, ceea ce a dovedit că plasmidele n-au conținut operonul *lac*.

e) *Construirea plasmidei pSomII-3*. Plasmida *pSom II* și DNA  $\lambda$  *plac* au fost hidrolizați cu *Eco RI*, iar fragmentele obținute au fost legate între ele cu DNA-ligază *T4*. Trebuie precizat că tratamentul DNA  $\lambda$  *plac* cu *Eco RI* generează un fragment de  $4,4 \times 10^6$  daltoni care conține controlul genei *lac* și gena  $\beta$ -galactozidazei. Inserția unui astfel de fragment în plasmida *pSom II* a determinat formarea unei plasmide relativ mari, de  $6,8 \times 10^6$  daltoni denumită *pSom II-3*. Aceasta a fost apoi folosită pentru a transforma celulele de *E. coli RR<sub>1</sub>*, iar transformanții au fost selecționați pentru *Ap<sup>r</sup>* (pe plăci *X-gal*, conținând ampicilină). Selecția lor s-a făcut și pe baza producerii de  $\beta$ -galactozidază, întrucât coloniile posedând plasmida cu gena  $\beta$ -galactozidazei devin, așa cum s-a arătat, albastre. Or, aproximativ 2% dintre clone

au fost albastre. Analiza DNA din plasmidele izolate din aceste clone a dovedit că plasmidele respective sînt purtătoare ale unui fragment de DNA de aproximativ  $4,4 \times 10^6$  daltoni care posedă locurile controlului operonului *lac* și cea mai mare parte din gena  $\beta$ -galactozidazei.

### IX.1.2. Identificarea somatostatinei în celulele bacteriene

Succesul deosebit al construcției DNA recombinant conținînd gena somatostatinei a constat mai ales în faptul că gena aceasta, sintetizată chimic, a reușit să se exprime într-o celulă bacteriană care nu are în mod normal informația genetică necesară pentru a o produce. Într-adevăr, analizele au arătat că în noua variantă obținută din tulpinile conținînd plasmidele *pSomII-3* se poate detecta prezența somatostatinei sintetizate. Testul cel mai sensibil este cel radioimunologic denumit pe scurt RIA (de la Radio-Immuno-Assay). Astfel, după tratamentul sedimentului celular cu acid formic 70% conținînd BrCN (5 mg/ml) și după eliminarea acidului formic din BrCN sub vacuum se poate pune în evidență existența somatostatinei în sediment. Testul RIA pune în evidență mai puțin de 10 pg de somatostatină în prezența a aproximativ 16  $\mu$ g de proteină bacteriană tratată cu BrCN.

Este de subliniat că tulpinile pozitive *pSomII-3* sau negative (*pSomII-2*) pentru somatostatină sînt instabile și ca atare cresc greu. Se presupune că acest dezavantaj este generat de superproducția galactozidazei incomplete și inactive. Totuși calculele au estimat că randamentul de producere a somatostatinei se poate ridica în unele cazuri chiar la 3% din cantitatea totală de proteine celulare. În majoritatea cazurilor însă randamentul este cuprins numai între 0,001 și 0,03%.

### IX.2. Construirea DNA recombinant conținînd gena insulinei

În anul 1977, Ullrich și colab., iar un an mai tîrziu, Crea și colab. au construit DNA recombinanți conținînd gena insulinei. Primul grup a sintetizat gena insulinei de șobolan enzimatic, cu ajutorul reverstranscriptazei și au introdus-o în plasmida *pMB9* ca vehicul, iar al doilea grup a sintetizat chimic genele corespunzătoare celor două catene polipeptidice ale insulinei umane prin metoda triesterilor și au folosit ca vehicul plasmida *pBR322*.

Cum metodele de sinteză a genelor pe cale enzimatică și chimică au fost descrise anterior, acest capitol va trata în principal aspecte privind strategia construirii DNA recombinant purtător al genei insulinei.



## IX.2.1. Aspecte structurale ale genei insulinei de șobolan

După cum este cunoscut, insulina de șobolan este compusă din două lanțuri (catene) polipeptidice (*A* și *B*), dar ea este produsul unei singure gene, întrucât precursorul insulinei este un polipeptid denumit proinsulină care conține cele două catene *A* și *B* legate între ele printr-un al treilea polipeptid denumit *C* (Steiner și colab., 1967). Aspectele structurale ale genei insulinei s-au complicat oarecum în momentul în care Chan și colab. (1976) au dovedit că produsul de traducere a mRNA specific insulinei nu este proinsulina, ci un precursor al proinsulinei, adică proproinsulina. Aceasta conține la capătul amino 20 acizi aminați în plus față de proinsulină. De aici s-a dedus că structura moleculei proproinsulinei de șobolan este:

NH<sub>2</sub>-(prepeptid)-lanț *B*-(peptid *C*)-lanț *A*-COOH.

S-au precizat aceste aspecte, întrucât DNA recombinant conținând gena insulinei de șobolan a conținut de fapt secvența nucleotidelor care codifică proproinsulina întreagă (Ulrich și colab., 1977). Această sinteză s-a realizat relativ ușor, întrucât utilizând mRNA specific insulinei cu matriță și reverstrascriptază ca enzimă, produsul reacției a fost tocmai gena proproinsulinei.

**IX.2.1.1. DNA recombinant format din plasmida pMB9 și gena proproinsulinei de șobolan.** Schema generală de construire a DNA recombinant conținând gena proproinsulinei de șobolan este redată în fig. 78. Principalele etape sînt:

a) *Sinteza genei proproinsulinei (pregătirea pasagerului).* În acest scop se extrage mRNA din insulele lui Langerhaus, se purifică pe coloană de oligodeoxitimidilat-celuloză, iar produsul pur este folosit ca matriță pentru sinteza de cDNA de către reverstrascriptaza din virusul mieloblastozei aviare. Enzima în prima etapă generează un hibrid, cDNA-mRNA, din care mRNA este îndepărtat prin hidroliza hibridului cu alcalii \*. cDNA monocatenar rezultat este convertit în cDNA bicatenar tot cu ajutorul reverstrascriptazei din virusul mieloblastozei aviare. Reamintim că formarea de cDNA monocatenar se realizează în prezența de oligo (dT)<sub>12-18</sub> ca primer, în timp ce formarea de cDNA bicatenar este autocatalitică; cDNA monocatenar servește atât ca matriță, cât și ca inițiator.

cDNA bicatenar conține o „bucă” monocatenară care este înlăturată prin tratarea lui cu nuclează S<sub>1</sub>—enzima care atacă numai porțiunea monocatenară a cDNA. În urma acestui tratament a rezultat un cDNA bicatenar fără „bucă”, avînd o catenă complementară față de mRNA specific proproinsulinei.

\* Alcaliile diluate (~ 0,3 M) hidrolizează numai RNA



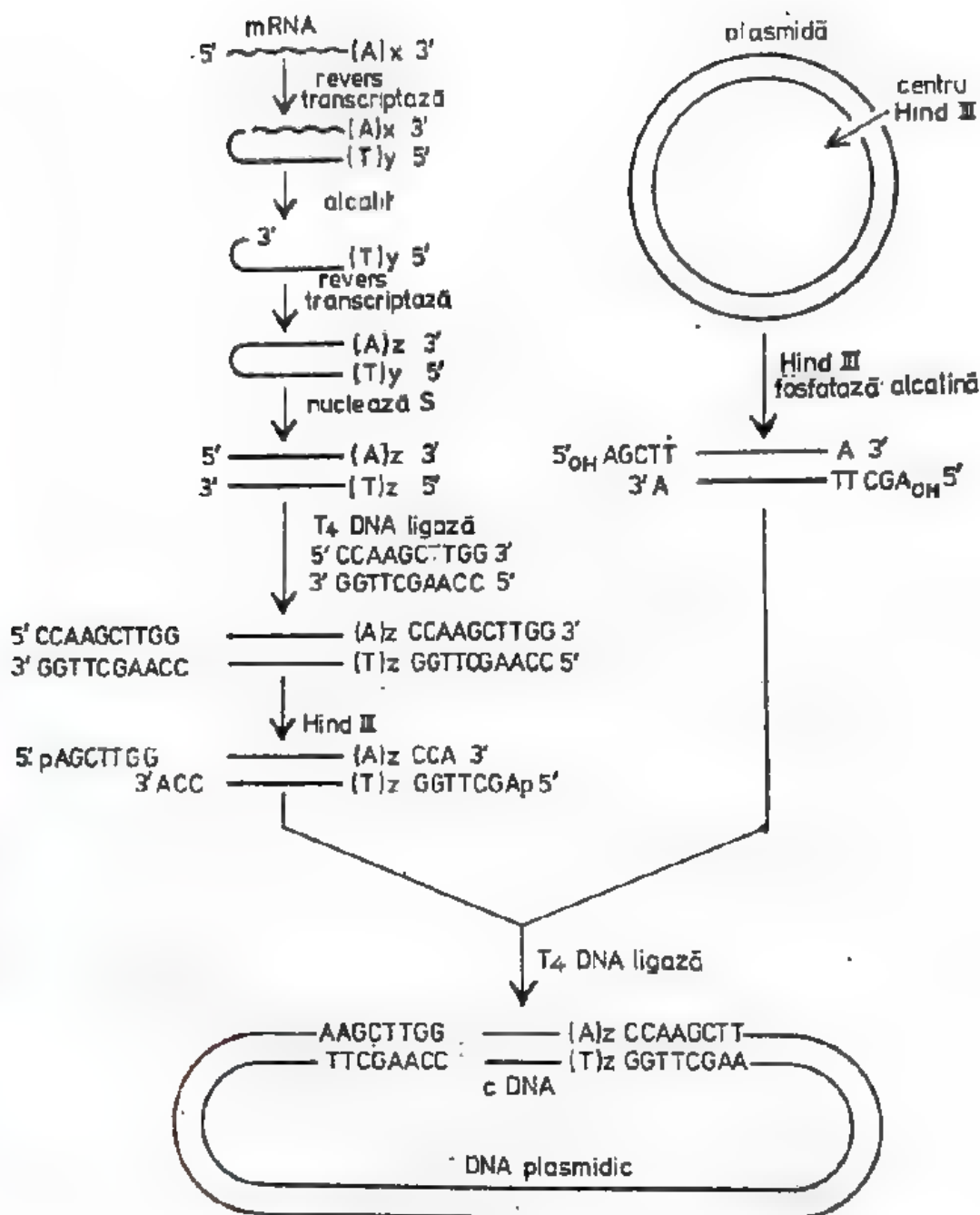
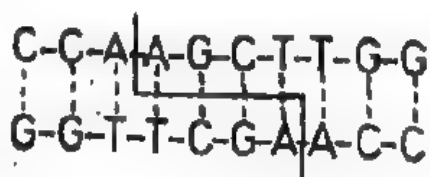


Fig. 78. Schema generală de construire a DNA recombinant din plasmida pMB9 și gena preproinsulinei de șobolan (după Ullrich și colab., 1977).

b) *Pregătirea cDNA pentru inserția lui în plasmidă.* Pentru a facilita inserția cDNA în plasmidă, capetele sale au fost prelungite în ambele sensuri cu un decamer care conținea situsul de clivare pentru enzima de restricție *Hind III* și anume:



Atașarea decamerilor de cDNA (ale cărui capete au devenit bica-tenare netede, deoarece nucleaza S1 a îndepărtat părțile monocatenare) s-a făcut cu ajutorul DNA ligazei T4. În continuare, cDNA având decamerii legați la cele două capete, a fost tratat cu enzima de restricție Hind III pentru a se obține capetele coezive terminale.

c) *Pregătirea plasmidei pMB9 (vehiculul)*. Pentru a introduce gena propreinsulinei în plasmidă, aceasta din urmă a fost scindată cu enzima de restricție Hind III. Precizăm că plasmida pMB9 are masa moleculară relativă de  $3,5 \times 10^6$  daltoni și conține un singur situs de clivare pentru Hind III și Eco RI. În plus, plasmida pMB9 conferă celulelor de *E. coli* imunitate la colicină și rezistență la tetraciclină. Situsul de clivare cu Hind III fiind situat în promotorul genei pentru rezistența la tetraciclină, DNA recombinant obținut cu ajutorul enzimei Hind III devine sensibil la tetraciclină.

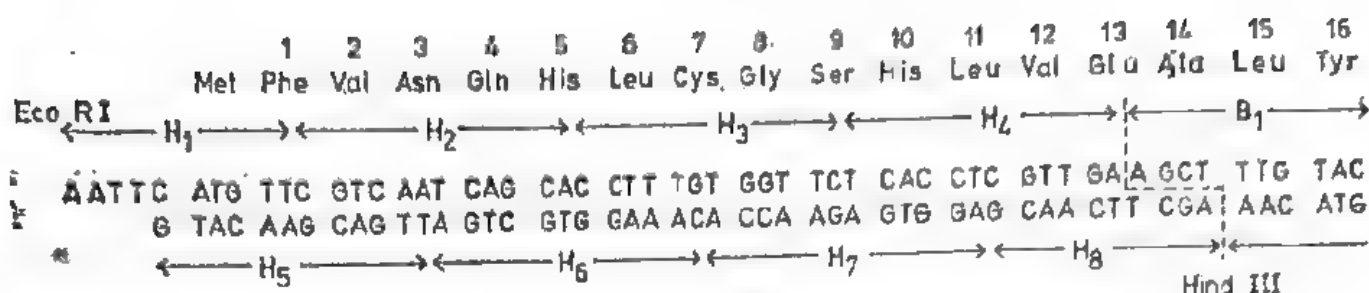
Plasmida tratată cu Hind III trece într-o formă moleculară liniară având capetele monocatenare coezive. Atât pentru a împiedica autocircularizarea moleculei prin capetele sale coezive, cât și pentru a îmbunătăți randamentul de cuplare a plasmidei cu cDNA posedând și el capete coezive create de Hind III, s-au luat următoarele două măsuri: 1) s-au îndepărtat grupările fosforice 5' terminale de la plasmidă prin tratamentul ei cu fosfatază alcalină și 2) s-a lucrat cu exces molar de plasmidă față de cDNA.

d) *Legarea genei de plasmidă*. Ultima operație necesară construirii DNA recombinant a fost legarea covalentă a genei propreinsulinei de plasmida pMB9, ambele pregătite, după cum s-a văzut, în mod special în acest scop.

Legarea s-a făcut prin incubarea amestecului de plasmidă (în exces) cu cDNA în prezența DNA-ligazei T4. Amestecul rezultat a fost folosit pentru a transforma celulele de *E. coli*  $\chi$  1776. Transformanții rezultați au fost selecționați și analizați pentru conținutul lor în DNA recombinant. Identificarea genei pasager din plasmidele selecționate s-a făcut atât prin testul hibridizării cu cDNA, cât și prin analiza secvențelor bazelor din DNA clonat.

IX.2.1.2. DNA recombinant format din plasmida pBR322 și genele insulinei umane. Pentru construirea de DNA recombinant conținând genele insulinei umane, Crea și colab. (1978) au adoptat o altă strategie. Insulina umană fiind constituită și ea din două lanțuri polipeptidice A și B, unite între ele prin legături disulfurice, iar secvența acizilor aminați-stabilită, aceasta a permis deducerea teoretică a secvenței nucleotidelor celor două gene corespunzătoare A și B. Genele au fost sintetizate chimic din 29 de oligodeoxiribonucleotide diferite având mărimi variabile între decameri și pentadecameri (fig. 79). De notat că genele au fost „proiectate” pentru sinteză, astfel încât, după introducerea lor în vehicul, să se exprime separat în *E. coli*, iar legăturile disulfurice dintre lanțurile

## Lanțul B



## Lanțul A

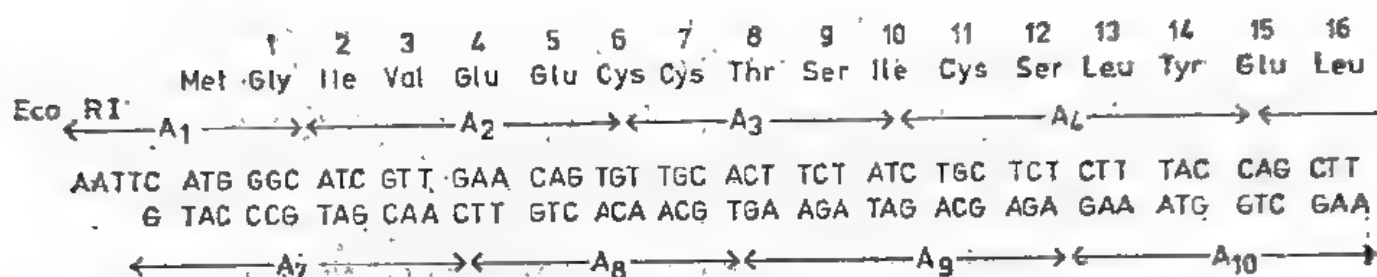


Fig. 79. Structura genelor *A* și *B*, corespunzătoare polipeptidelor *A* și *B* ale insulinei tidele insulinei umane. Gena *A* a fost sintetizată din 12 oligonucleotide, notate cu *A*<sub>1</sub>—*A*<sub>12</sub>.

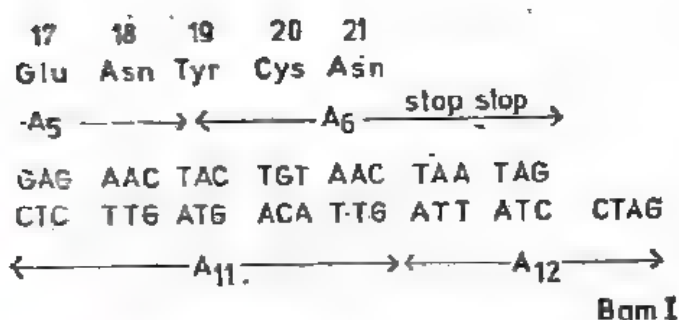
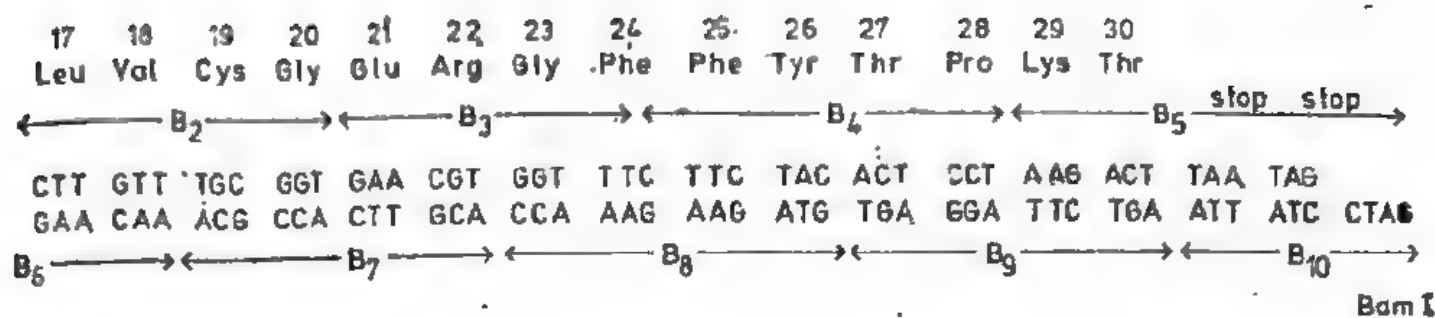
*A* și *B* să se formeze *in vitro*. Cu alte cuvinte, s-a mers pe ideea sintezei chimice a două gene (*A* și *B*), care introduse într-o plasmidă să determine sinteza unor polipeptide hibride, incluzând și secvența acizilor aminați ai lanțurilor *A* și *B* ale insulinei umane.

Eliberarea lanțurilor *A* și *B* din polipeptidele hibride s-a făcut prin scindarea cu bromură de cianogen a precursorilor polipeptidelor acide. Insulina umană activă a rezultat prin formarea corectă *in vitro* a legăturilor disulfurice dintre *A* și *B* după purificarea lor.

Pentru a construi DNA recombinant din genele *A* și *B* ale insulinei umane pe de o parte, și ale plasmidei *pBR322*, pe de altă parte, fiecare genă sintetizată a avut la capetele ei 5' secvențe de nucleotide monocatenare coezive specifice pentru enzimele de restricție *Eco RI* și *Bam HI*. Plasmida *pBR322* cu masa moleculară de  $2,6 \times 10^6$  daltoni are câte un situs pentru *Bam HI* și *Eco RI*. Ca atare, tratamentul plasmidei cu aceste enzime a generat capete coezive care, în prezența genelor *A* și *B* (având și ele aceleași capete coezive), au format DNA recombinant corespunzător.

IX.2.1.3. Îmbunătățirea randamentului de producere a insulinei. Dacă catena *A* (conținând 21 de acizi aminați) și catena *B* (30 de acizi





umane sintetizate chimic. Rîndul de sus prezintă secvența acizilor aminați din polipeptidul genului B din 18 oligonucleotide H<sub>1</sub> — H<sub>8</sub> și B<sub>1</sub> — B<sub>10</sub> (după Crea și colab., 1978).

aminați) sînt sintetizate separat în două tulpini bacteriene ca părți componente a unei proteine precursoră — β-galactozidaza, randamentul de producere a insulinei crește considerabil (Goedell și colab., 1979, Riggs și Itakura, 1979). Astfel, se poate ajunge ca aproximativ 20% din proteina bacteriană să fie constituită din proteina precursor β-galactozidază-insulină. Valoarea este considerată însă minimală pentru că se speră ca, în curînd, toată proteina sintetizată de bacteria transformată să conțină numai produsul dorit. Catenele de insulină sînt clivate din proteina precursoră prin tratament cu BrCN care este un reactiv specific de clivare a proteinelor la nivelul acidului aminat metionina. De reținut că sinteza genelor insulinei umane s-a făcut în așa fel încît la exprimare insulina produsă să se lege printr-o moleculă de metionină de β-galactozidază.

Catenele de insulină A și B eliberate separat în urma tratamentului au fost cuplate între ele prin oxidare cu aer. Aproximativ 80% din catene se cuplează în urma acestui tratament dînd naștere la insulină activă, fapt dovedit prin analiză chimică, imunologică și biologică. În urma acestor cercetări, producerea comercială a insulinei de bacterie pare a fi rezolvată. Dealtfel, două firme din S.U.A. — Genentech Inc. (South San Francisco, California) și Ely Lilly Inc. (Indianapolis,

Indiana) pun la punct producția pe scară largă a insulinei (Riggs și Itakura, 1979). Schema generală de producere a insulinei active este prezentată în fig. 80.

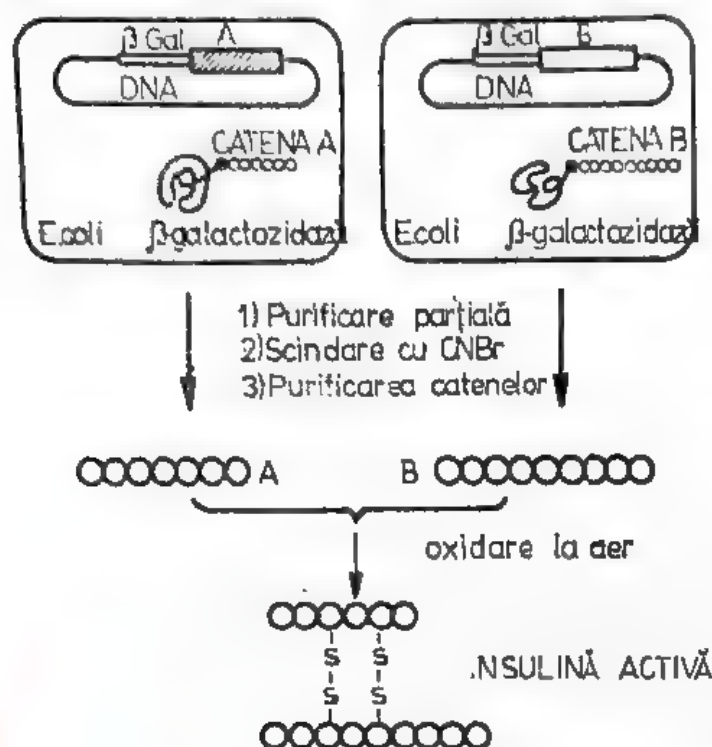


Fig. 80. Procedul de producere a insulinei umane în *E. coli*. Se construiesc separat două tulpini de *E. coli*: una conține gena *A*, iar a doua gena *B* a insulinei, împreună cu gena  $\beta$ -galactozidazei inserată în plasmidă (după Riggs și Itakura, 1979).

### IX.3. DNA recombinant conținând gene ale virusului hepatitei B (VHB)

Tehnologia DNA recombinant a fost introdusă în studiul virusului hepatitei B în două scopuri. În primul rând, a contribuit la localizarea și analiza structurii genelor. Aceste cercetări au avut ca rezultat elucidarea structurii primare a genomului VHB, stabilindu-se și caracteristicile principale ale genelor implicate în codificarea componentelor sale (Galibert și colab., 1979; Pasek și colab., 1979).

În al doilea rând, cercetările au fost inițiate pentru a găsi modalitatea exprimării genelor VHB în celulele bacteriene, în vederea producerii pe scară industrială a antigenelor VHB. Această direcție de cercetare are și ea o importanță deosebită, deoarece — așa cum se cunoaște — VHB nu poate fi cultivat în culturi celulare, iar în mod normal, el infectează numai omul și maimuța. Or, plasma donatorilor de sânge — sursa principală de obținere a VHB — fiind limitată, tehnologia DNA recombinant oferă posibilitatea obținerii de cantități suficiente de virus atât pentru studiul la nivel molecular al virusului, cât și pentru producerea în cantități mari de antigene virale necesare diagnosticului și preparării de vaccinuri.

Foarte recent, fragmentele de DNA VHB au fost clonate în celule de *E. coli* prin tehnologia DNA recombinant, utilizându-se plasmide

(Burrell și colab., 1979) sau derivați ai bacteriofagului  $\lambda$  (Charnay și colab., 1979). Unele celule transformate de DNA recombinanți au produs antigene virale puse în evidență prin reacții serologice specifice.

### IX.3.1. Cîteva date despre virusul hepatitei B

Dintre cele trei virusuri care produc hepatita — virusul A, virusul B și virusul non A non B — avînd caracteristici etiologice, structurale, imunologice și epidemiologice distincte, virusul hepatitei B prezintă o importanță cu totul deosebită. Virusul hepatitei B (VHB) infectează omul în proporție ridicată. Statisticile arată că 10% din populația Europei de vest și S.U.A. este purtătoare a unui marker serologic al VHB și anume a antigenului de suprafață ( $\text{AgHB}_s$ ) sau a anticorpilor corespunzători ( $\text{AcHB}_s$ ) (Szmuness și colab., 1978).

Mai mult chiar în unele arii din Africa tropicală și sud-estul Asiei acest procent se ridică la 60% — 70% (Szmuness, 1975). Hepatita B — sau hepatita serică, hepatita post-transfuzională, hepatita prin ser homolog, hepatita asociată cu antigenul Australia, hepatita cu incubare lungă cum mai este denumită — este o boală transmisibilă parenteral sau oral în primul rînd prin sînge. În cele mai multe cazuri vindecarea se face spontan, dar virusul poate cauza complicații severe, cum ar fi hepatita fulminantă, hepatita cronică, ciroza și uneori chiar hepatocarcinoame (Rodeker, 1975). Este important de semnalat că, în întreaga lume există cel puțin 120 de milioane de purtători cronici de  $\text{AgHB}_s$ , așa-numiții purtători sănătoși (Szmuness, 1975).

### IX.3.2. Structura virusului hepatitei B

Virionii hepatitei B au o structură complexă. Particulele au formă sferică cu diametrul de 42 nm și sînt cunoscute în literatură de specialitate sub denumirea de *particule Dane*. Plasma pacienților infectați cu virusul hepatitei B și chiar cea a unor donatori de sînge sănătoși conține particule Dane care, după proprietățile lor serologice și biochimice, sînt considerate virionii infectanți ai hepatitei B. La suprafața particulelor există un înveliș care conține antigenul de suprafață, denumit  $\text{AgHB}_s$ , iar în interiorul lor un miez (*core*) cu diametrul de 27 nm conținînd al doilea antigen, denumit  $\text{AgHB}_c$ . Miezul mai conține DNA viral cu masa moleculară de  $2 \times 10^6$  daltoni și o DNA polimerază DNA dependentă. Se pare că genomul viral codifică și al treilea antigen —  $\text{AgHB}_e$  — care se găsește atît liber, cît și asociat cu particulele Dane în plasma unor pacienți (Ohori și colab., 1979).

Specificitatea  $\text{AgHB}_s$  este conținută într-un singur polipeptid de 22.000 daltoni. Componentele polipeptidice adiționale existente în  $\text{AgHB}_e$  par să conțină însă aceleași specificități antigenice. Miezul



viral (AgHB<sub>e</sub>) conține cel puțin un polipeptid de 19 000 de daltoni și posibil, cantități mici de componente polipeptidice cu masă moleculară mare. Specificitatea antigenică a acestor polipeptide nu este bine definită, dar cercetări recente sugerează că polipeptidul de 19 000 daltoni reacționează cu anticorpi anti-HB<sub>e</sub>. Antigenul AgHB<sub>e</sub>, distinct din punct de vedere structural și antigenic de AgHB<sub>s</sub> și AgHB<sub>c</sub>, apare sub forma unui complex de antigene, exclusiv în serurile AgHB<sub>e</sub> pozitive. (Robinson și colab., 1979 b.)

Prezența AgHB<sub>e</sub> în sânge este o indicație că sângele conține virusul HB, astfel că AgHB<sub>e</sub> este considerat ca markerul specific al infecției cu virusul de tip B.

### IX.3.3. Structura genomului virusului hepatitei B

Așa cum s-a arătat, miezul virusului conține o moleculă de DNA circulară bicatenară, cu o regiune monocatenară care ocupă în diferite molecule 15% — 45% din lungimea cercului. Se poate deci spune că acest DNA constă dintr-o catenă scurtă de lungime variabilă (1800 pînă la 2700 de nucleotide) și dintr-o catenă lungă cu o lungime constantă de 3250 de nucleotide (Robinson, 1977). Catenă lungă are o creștătură (*nick*) situată într-un loc unic, la o distanță de 1860 de nucleotide spre dreapta de la situsul Eco RI din DNA VHB. Capătul 5' al catenei scurte este într-un loc unic situat la aproximativ 1600 de nucleotide spre dreapta de la situsul Eco RI. Spre deosebire de acesta, capătul 3' nu este fix, poziția lui variind în diferite molecule. În regiunea moleculei de DNA de la capătul 3' pînă la capătul 5' (regiune monocatenară variabilă) acționează DNA polimeraza, care determină sinteza unor molecule total bicatenare de DNA viral. Între capătul 5' al catenei scurte și creștătura din catenă lungă există o zonă moleculară de aproximativ 260 de perechi de baze. DNA circular poate fi convertit în forme liniare prin încălzirea moleculei la 77°C în soluție de NaCl 0,01M. Formele liniare astfel generate pot fi recircularizate prin incubare în NaCl 0,1M la 60°C (Robinson și colab., 1975a).

Secvența completă — structura primară a genomului VHB — a fost determinată de Galibert și colab. (1979). Aceasta constă din 3182 de nucleotide înlanțuite specific. Capacitatea de codificare, judecată după conținutul în codoni *nonsens* a catenei lungi (L), este mai mare decît a catenei scurte (S). Autorii au localizat existența în genom a opt regiuni deschise, capabile de a codifica lanțuri polipeptidice mai mari de 100 de acizi aminați. Regiunea 6 este cea mai mare și acoperă aproximativ 80% din genom. Gena S, care codifică polipeptidul I al AgHB<sub>e</sub>, a fost localizată între coordonatele 95,1 și 73,6 și este conținută în regiunea 7 (fig. 81).

Comparând structura primară a unor mRNA virali sau celulari cu cea a fragmentelor de genom s-au pus în evidență o serie de secvențe de DNA remarcabile. Astfel, secvența 5'TATAAA — care ar putea corespunde unui semnal precizând inițierea transcrierii — a fost găsită începând cu nucleotidul 1269 de pe catena scurtă (S). Aceeași secvență a fost găsită odată și în catena lungă (L) la poziția nucleotidelor 689, 243.

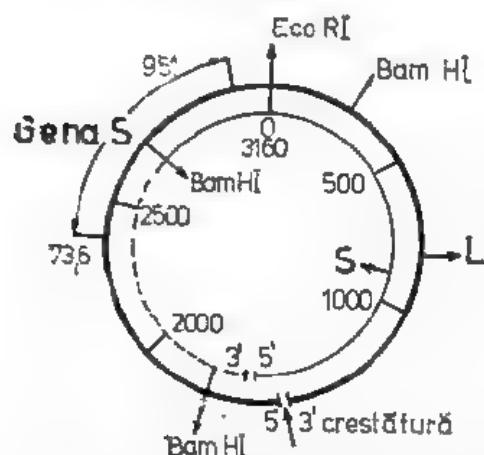


Fig. 81. Harta fizică a genomului virusului hepatitei B. Se prezintă și situsuri de acțiune a enzimelor de restricție Eco RI (originea hărții) și Bam HI.

Utilizându-se un program de calculator s-au pus în evidență și codonii *nonsens* de pe ambele catene DNA. Numărul și distribuția codonilor *nonsens* s-a dovedit a fi diferită în catenele L și S. Considerând că în genom distribuția nucleotidelor este întâmplătoare s-a estimat că ar exista aproximativ 50 de codoni *nonsens*. Or, analiza secvenței a arătat că în catena L sînt 61, 60 și 40, iar în catena S 32, 29 și 15 codoni *nonsens* în fiecare fază ceea ce susține ideea rolului lor specific în funcția genomului.

#### IX.3.4. DNA recombinant conținînd gena pentru antigenele virusului hepatitei B

**IX.3.4.1. DNA recombinant din plasmida pBR322 și DNA VHB** (obținut de Burrell și colab., 1979). Genomul DNA din particule Dane a fost marcat cu  $^{32}\text{P}$  prin reacția endogenă controlată de DNA polimeraza proprie, în prezența celor patru nucleotidtrifosfați. Apoi DNA marcat s-a extras din virioni și s-a scindat cu enzimele de restricție Eco RI și Bam HI. În paralel, plasmida pBR322, utilizată ca vehicul, a fost și ea scindată cu aceleași enzime de restricție pentru a avea aceleași capete coezive la vehicul și pasager. Fragmentul mare de DNA pBR322, rezultat în urma scindării cu enzimele de restricție mai sus menționate, împreună cu fragmentele de DNA ale genomului viral obținute în reacția de restricție, au fost amestecate și incubate în prezența DNA-ligazei T4 pentru a obține DNA recombinant.

Alți DNA recombinanți au fost obținuți din plasmida pBR322 restrictată cu Pst I și din fragmente de DNA VHB preparate cu alte



enzime de restricție și fragmente rămase de la digestia cu *Eco RI* și *Bam HI*.

Apoi, cu ajutorul polinucleotidfosforilazei terminale s-au adăugat capete coezive de oligo (dC) la fragmentele de genom și capete coezive de oligo (dG) la plasmida restrictată de *Pst I*. Aceste componente amestecate au fost întrebuințate pentru transformarea celulelor de *E. coli*. Prezența secvențelor de DNA VHB în coloniile rezistente la antibiotice a fost confirmată prin tehnica de hibridizare a coloniilor. Exprimarea fragmentelor de DNA VHB inserate în plasmidă a fost dovedită prin punerea în evidență a antigenelor virale sintetizate de *E. coli* prin testul radioimunologic (RIA).

Toate plasmidele care au indus în celulele-gazdă (*E. coli*) sinteza de antigene virale identificate cu RIA (plasmidele *pHBV64*, *pHBV66*, *pHBV110* și altele), examinate prin microscopie electronică au conținut secvența nucleotidelor DNA VHB cu aceeași orientare.

Fragmentele de DNA VHB eliberate (prin tratamentul plasmidelor cu enzime de restricție) au fost analizate prin metoda degradării chimice și s-a stabilit secvența nucleotidelor lor. Analizele au arătat că ele au conținut aproximativ 87% din secvențele genomului viral (Pasek și colab., 1979).

**IX.3.4.2. DNA recombinant din fagul  $\lambda$ -gt. WES și DNA VHB** (obținut de Fritsch și colab., 1978). DNA viral a fost reparat prin reacția enzimatică endogenă dirijată de DNA polimeraza virală în prezența celor patru nucleotidtrifosfați. După ce reacția s-a terminat, DNA viral întreg a fost clivat cu *Eco RI* și atașat de vehiculul  $\lambda$  gt.WES. DNA recombinant rezultat a fost denumit *Eco HBV DNA*. Acest produs clonat în *E. coli* a fost utilizat pentru determinarea structurii primare a genomului VHB (Galibert și colab., 1979).

#### **IX.4. DNA recombinant conținând gena hemaglutininei virusului gripal**

Progresele spectaculoase obținute de tehnologia DNA recombinant în domeniul descifrării structurii și secvenței operonilor bacterieni, precum și a elementelor de control, fac astăzi posibilă sinteza în celula bacteriană a unor cantități apreciabile de proteine (virale sau de altă natură), utilizabile în diferite scopuri. S-a deschis astfel calea producerii pe scară industrială a proteinelor virale (antigene) în vederea utilizării lor ca vaccinuri. Această perspectivă este extrem de importantă în situația actuală când, gripa, de exemplu, rămâne încă o infecție majoră la om, cu multiple consecințe sociale și economice.

Astfel, s-a estimat că virusul gripal a determinat în anul 1918, direct sau indirect, moartea a 20 de milioane de oameni (Palese, 1977),



iar în anii 1968—70 virusul gripal de tip Hong Kong a fost responsabil de pierderea a 25 milioane de zile de muncă în Anglia, în timp ce pagubele produse de același tip de virus în S.U.A. (în anii 1968—1969) s-au ridicat la 3,8 miliarde de dolari (Emtage și colab., 1980). Rezultă că prevenirea prin vaccinări a epidemiilor de gripă este o problemă majoră a asigurării sănătății publice.

#### IX.4.1. Structura virusurilor gripale

Cu toate că virusurile gripale au fost izolate pentru prima oară în jurul anului 1930 (Shope, 1931 - a izolat virus gripal de la porci, iar Smith și colab., 1933 — de la om), structura lor a fost recent stabilită. Se cunosc trei tipuri diferite de virusuri gripale, notate cu A, B și C. Primele două sînt mai importante, deoarece produc infecții severe la om. În același timp ele sînt bine caracterizate atît biochimic, cît și genetic. Al treilea tip nu este încă suficient de studiat și cunoscut. Clasificarea celor trei tipuri s-a făcut pe baza proprietăților imunologice specifice ale proteinelor lor interne și anume a proteinei nucleocapsidei (NP) și a proteinei membranei interioare (M). În general, particulele virale au o formă sferică (diametrul 100 nm), dar există și forme filamentoase sau pleomorfe. Compoziția chimică a virusurilor gripale de tip A și B este următoarea: RNA 1%, hidrați de carbon 7%, lipide 22% și proteine 70%. Analiza componentelor a precizat, printre altele, că RNA este monocatenar și segmentat. Electroforeza în gel de poliacrilamidă a arătat că virusurile gripale de tip A și B conțin cîte 8 segmente de RNA (Pons, 1976; Ritchey și colab., 1976). Pentru virusul gripal de tip C s-au găsit numai patru segmente de RNA (Palese, 1977).

Fiecare tip de virus are segmente specifice de RNA, iar studiul efectuat pe diferiți recombinanți privind corelația mărimii lor cu aceea

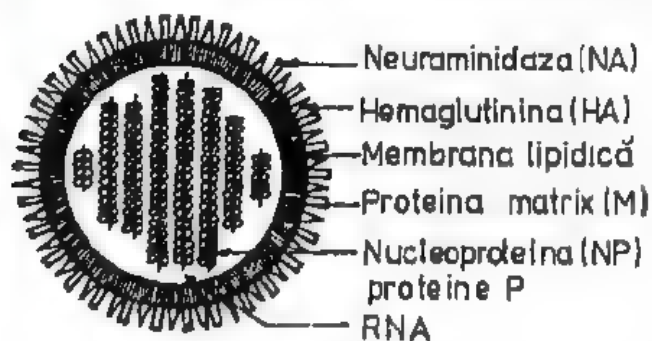


Fig. 82. Prezentarea schematică a structurii virusurilor gripale de tip A (după Palese, 1977).

a proteinelor, a permis identificarea funcției fiecărui segment de RNA. S-a ajuns astfel la concluzia că genomul virusurilor gripale de tip A și B este alcătuit din 8 segmente de RNA, fiecare segment reprezentînd de fapt o genă care controlează sinteza unei componente proteice a virusului. Fig. 82 prezintă schematic componentele virusului gripal de tip A sau B.

La suprafața virusului se găsesc distribuite ca niște spine două componente glicoproteice: hemaglutinina și neuraminidaza. Ele sînt fixate în membrana lipidică exterioară a virusului, care la rîndul ei învelește membrana internă sau proteina matrix (M) a virusului. În interiorul particulei se găsește nucleocapsida care conține segmentele de RNA complexate cu proteine (nucleoproteine) și proteinele P implicate în activitățile polimerazice ale virusului.

#### IX.4.2. Cartarea genei hemaglutininei

Pentru a identifica atît genele specifice, cît și produsele genelor, Palese și Schulman (1976), primii cercetători care au cartat genele virusurilor gripale, au folosit strategia prezentată în continuare. Mai întîi s-au obținut virusuri recombinante, prin coinfectia celulelor cu două virusuri gripale parentale bine caracterizate: virus PR<sub>8</sub> și Hong Kong (HK). Apoi s-a efectuat selecționarea virusurilor cu antiser anti-hemaglutinină PR<sub>8</sub> și antineuraminidază HK, ceea ce a determinat ca recombinantul izolat să conțină hemaglutinină HK și neuraminidază PR<sub>8</sub>. Mai departe, parentalul HK a fost iradiat cu raze UV; în urma acestui tratament cei mai mulți recombinanți viabili obținuți, după selecția cu serul anti, au avut hemaglutinina de la parentalul HK și toate celelalte gene de la parentalul PR<sub>8</sub> netratat cu raze UV. Invers, recombinantul PR<sub>8</sub>—HK, conținînd gena hemaglutininei PR<sub>8</sub> și neuraminidaza HK,

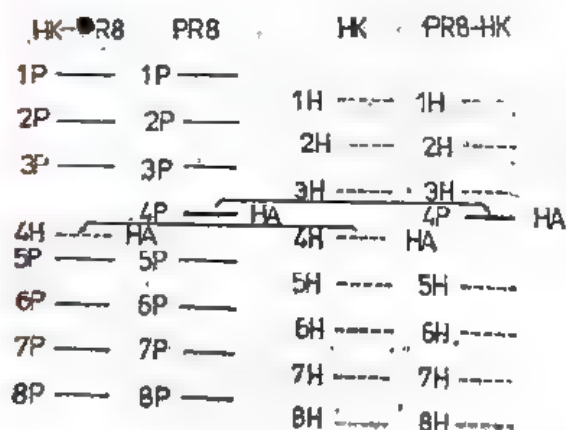


Fig. 83. Strategia utilizată pentru identificarea genei hemaglutininei. Sînt prezentate genele virusului APR8/34 și A/HK/8/68 și a recombinanților HK-PR8 (hemaglutinină HK și neuraminidază PR8) și PR8-HK (hemaglutinină PR8 și neuraminidază HK), sub formă de linii orizontale (după Palese, 1977).

s-a obținut din virusurile HK și virusul PR<sub>8</sub> tratate cu raze UV, bineînțeles după selecția făcută — de data aceasta — cu antiser anti-hemaglutinina HK și antineuraminidaza PR<sub>8</sub>. Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă a acizilor ribonucleici din virusurile parentale și din recombinanți a arătat în mod clar că în fiecare caz numai segmentul de RNA notat cu 4 (numărul 1 reprezentînd segmentul cu mobilitatea electroforetică cea mai mică) este modificat, ceea ce a constituit dovada că el reprezintă de fapt gena hemaglutininei (fig. 83).

Prin urmare, segmentul de RNA numărul 4 este gena de interes care se izolează, iar pe modelul ei se sintetizează o copie, adică DNA complementar.

### IX.4.3. Structura hemaglutininei

Hemaglutinina este principala componentă virală de suprafață implicată în reacțiile imunologice specifice infecției gripale. Subunitatea funcțională a hemaglutininei este reprezentată de un spic avînd o formă de baston, aflat pe suprafața virusului (fig. 78). Ea este o glicoproteină triunghiulară, cu masa moleculară de aproximativ 250000 daltoni și este compusă din trei monomeri de aproximativ 80000 daltoni fiecare (Wiley și colab., 1977). S-a stabilit că monomerii de hemaglutinină sînt sintetizați sub formă de lanțuri polipeptidice conținînd la capătul N-terminal precursori de peptide. În cazul virusului gripal de tip FPV (pestă aviară) precursorul polipeptidic este format din 18 acizi aminați (Porter, 1979). Probabil că în timpul maturării și asamblării virusului, pre-hemaglutinina trece în hemaglutinină 1 și hemaglutinină 2, care rămîn legate între ele prin legături disulfurice (Laver, 1971).

**IX.4.3.1. Structura primară a genei hemaglutininei.** Primele informații despre structura primară a genei hemaglutininei s-au obținut indirect prin analiza secvenței peptidelor din hemaglutinina matură a tulpinilor de virus gripal de tip H1N2 și H2N2 (Ward și Dopheide, 1979; Waterfield și colab., 1979).

A doua variantă utilizată în același scop a fost tot indirectă, bazată pe tehnologia DNA recombinant. Ea a constatat în sinteza DNA complementar al genei hemaglutininei, clonarea cu ajutorul unei plasmide și analiza secvenței nucleotidelor sale (Porter și colab., 1979).

S-au ales aceste variante ocolindu-se analiza directă a structurii întrucît atît secvența acizilor aminați dintr-o proteină, cît și secvența nucleotidelor dintr-un DNA sînt mult mai ușor de analizat decît secvența nucleotidelor unui RNA înalt polimerizat, cum este și cazul genei hemaglutininei.

Dintre cele două variante indirecte prezentate cea de a doua are o importanță deosebită. Cu ajutorul ei se poate prezice secvența completă a acizilor aminați din hemaglutinina matură și, în același timp, se indică secvența oricărui peptid care este îndepărtat în timpul maturării ei. În plus, ea permite cunoașterea existenței în genă a unor secvențe netraduse (*introni*) care întrerup regiunea codificată a genei.

Cu ajutorul tehnologiei DNA recombinant Porter și colab. (1979) au determinat pentru prima dată structura primară a genei hemaglutininei virusului pestei aviare. Acest virus, la fel ca și celelalte virusuri gripale, este un virus cu catenă negativă, avînd genomul format din



8 segmente de RNA, dintre care două segmente codifică antigenele de suprafață (hemaglutinina — gena 4 și neuraminidaza).

Gena hemaglutininei s-a dovedit a avea lungimea de 1742 nucleotide, cu 300 de nucleotide mai puțin decât valoarea obținută anterior pe baza migrării RNA în gel de poli-acrilamidă cu formamidă. Regiunea codificată începe cu tripletul AUG și este terminată de un codon *nonsens* UAA. În jurul nucleotidelor 1030—1050 se găsește o secvență neobișnuită de purine, dintre care cele mai multe codifică peptidul care colectează cele două subunități HA<sub>1</sub> și HA<sub>2</sub> ale hemaglutininei.

Analiza genei hemaglutininei\* a arătat că în timpul transcrierii RNA viral *in vivo*, mRNA determină sinteza mRNA viral adăugând la fiecare capăt 5' câte 10—15 nucleotide suplimentare. În schimb, la celălalt capăt transcrierea se termină prematur, probabil la secvența U, care se situează între nucleotidele 17 și 23 de la capătul 5' al RNA viral matriță. Astfel, regiunile 5' și 3' necodificate conțin 31—36 și respectiv 9 nucleotide. Rezultă că regiunea 3' este scurtă în comparație cu regiunile corespunzătoare a altor mRNA din celulele eucariote.

Gena hemaglutininei nu conține secvența semnal 5'—AAUAAA-3', care a fost găsită în regiunea 3' necodificată a diferitelor mRNA de origine eucariotă. O situație asemănătoare s-a găsit însă și în cazul mRNA din virusul stomatitei veziculare și din virusurile picorna.

O altă caracteristică a genei este aceea că la capătul 3' din 15 nucleotide 12 sînt identice, fapt semnificativ care ar putea constitui semnalul pentru inițierea replicării. De remarcat și particularitatea genei care în regiunea ei 5' necodificată, lângă semnalul AUG, să conțină o secvență de nucleotide omoloagă cu locul de legare de ribozomi a mRNA din procariote (mRNA timpuriu din bacteriofagul T7, de exemplu).

Gena hemaglutininei conține o secvență caracteristică bogată în purine AGGGG, care interacționează cu capătul 3' al rRNA 16S din procariote. Ea este urmată imediat de secvența UUACA, situație găsită și la unele procariote. Aceste caracteristici, împreună cu experiențele de exprimare a genei hemaglutininei în sistem bacterian (*E. coli*), susțin ideea că hemaglutinina are un pronunțat caracter procariot!

#### IX.4.4. Sinteza genei hemaglutininei

Pentru a obține copia genei hemaglutininei, adică DNA complementar (cDNA) bicatenar corespunzător, capabil de a fi inserat într-o plasmidă, s-a pornit de la RNA total din virion și nu de la segmentul de RNA 4 (gena hemaglutininei) separat de celelalte segmente de RNA

\* Structura primară a genei hemaglutininei nu o prezentăm, deoarece numai prezentarea schematică a celor 1740 de nucleotide care o compun ar ocupa două pagini de text!

RNA viral total a fost întâi poliadenilat, iar cele două catene de cDNA s-au sintetizat cu reverstranscriptază, iar zona (bucă) monocatenară a fost îndepărtată prin tratament cu nuclează S1. Capetele cDNA bica-tenar rezultat au fost reparate cu DNA polimerază I, în prezența celor patru deoxitriofosfați. Paralel, s-a marcat cu kinază un linker sintetic pentru situsul enzimei de restricție *Hind* III (d CCAAGCTTGG), linker ce a fost apoi legat cu DNA-ligază T4 de amestecul de gene. Excesul de linker nelegat s-a îndepărtat prin digestie cu *Hind* III și cromato-grafie pe coloană de Sephadex G-150. Produsul exclus de pe coloană, care a conținut genele, a fost utilizat la legarea de plasmida *pBR322*. În acest scop, DNA *pBR322* a fost hidrolizat cu *Hind* III și tratat cu fosfatază alcalină bacteriană. După îndepărtarea enzimei cu etanol, DNA plasmidial liniar defosforilat s-a legat la amestecul de gene cu ajutorul DNA-ligazei T4. Apoi produsul rezultat a fost utilizat la trans-formarea tulpinii *E. coli* K12HB101. Cultura bacteriană a fost trecută pe agar L în prezență de ampicilină. DNA plasmidial s-a izolat și purificat din coloniile sensibile la tetraciclină, iar apoi s-a examinat prin electroforeză în gel de agaroză 1,4%, după tratament cu enzima de restricție *Hind* III.

Pentru a stabili care genă virală a fost inserată în fiecare plasmidă, DNA plasmidial a fost hibridizat cu gene virale marcate cu  $^{32}\text{P}$ , separate electroforetic. Din 13 colonii  $\text{Tc}^r$  obținute, purtătoare de gene inserate, una — denumită *pBR322-FPV*<sub>4-10</sub> — a conținut un fragment supli-mentar de DNA, lung de aproximativ 1700 de nucleotide. Această colonie a hibridizat specific cu gena 4 (pentru hemaglutinină) marcată cu  $^{32}\text{P}$ . Procentul de hibridizare a coloniei cu gena 4 a fost de 59,7%. Cu celelalte gene hibridizarea a fost nulă sau mai mică de 3%, ceea ce a demonstrat că plasmida *pBR322 -FPV*<sub>4-10</sub> conține copia genei hema-glutininei. În continuare această colonie a fost amplificată, iar analizele au confirmat că ea a conținut copia genei pentru hemaglutinină inclusă în plasmidă.

#### IX.4.5. Obținerea de DNA recombinant conținând gena hemaglutininei

Pentru a obține un DNA recombinant conținând o genă care în mod natural este produsă de celulele eucariote, DNA capabil să se exprime în bacterie, este neapărată nevoie ca atât gena în care este inserat pasagerul să conțină semnalele de control adecvate, cât și faptul ca gena să fie plasată în poziție corectă pentru a fi citită și tradusă. Gena trebuie să fie „în fază”, adică să fie situată lângă situsul de legare la ribozomi, în dreapta promotorului și, în același timp, să conțină semnalele de pornire și oprire a sintezei.

În acest scop s-au realizat o serie de vectori avînd la bază plasmidul *pBR322* (*pWT111*, *pWT121* și *pWT131*), vectori care la situsul *Hind* III conțin un fragment de DNA avînd: regiunea de control a operonului de triptofan, zona de codificare a situsului de legare la ribozom și a primilor 7 aminoacizi ai genei *trpE*. Acești vectori au proprietatea de a asigura citirea în fază corectă a oricărei gene inserate (Tacon și colab., 1980).

Astfel, secvența nucleotidelor în jurul situsului *Hind* III al vectorului *pWT121* și a unei părți din gena hemaglutininei virusului pestei aviare (FPV) este:

*pWT121*—ATG, CAA, ACA, CAA, AAA, CCG, ACT, CCA, AGC, TCC,  
Met Glu Thr Glu Lys Pro Thr Pro Ser Lys

specificați de *trpE*

AAG, CTT ...

Leu

10

20

FPV-HA-A AGCTTGG(T)<sub>19</sub> AGCAAAAGCAGGGGTTACAAAATG,  
Met

iar gena FPV-HA clonată în *pWT121* orientat în poziția corectă (spre dreapta) va produce:

—40 —30  
ATG, CAA, ACA, CAA, AAA, CCG, ACT, CCA, AGC, TCC, AAG,  
Met Glu Thr Glu Lys Pro Thr Pro Ser Ser Lys

specificați de *trpE*

—20

—10

10

CTT, GGT, TTT, TTT, TTT, TTT, TTT, TTT, AGC, AAA,  
Leu Gly Phe Phe Phe Phe Phe Phe Ser Lys

20

AGC, AGG, GCT, TAC, AAA, ATG, AAC, A...  
Ser Arg Gly Tyr Lys Met Asn

FPV pre-HA

În ceea ce privește regiunea pre-AUG, conținînd semnalul de start al mRNA specific hemaglutininei, secvența genei are asigurat potențialul de legare prin legături de hidrogen în modul următor:

RNA-16S: 5'...G G A U C A C C U c C U U A—OH  
A U U G G G G A C G A A A A...5'  
C A A A AUG ... 3'

Reamintim că situsul de legare a ribozomului — care interacționează cu mRNA în cursul sintezei proteice — se găsește localizat pe RNA 16S din subunitatea mică și are secvența de nucleotide menționată anterior.

Structura genei și a fragmentului de DNA inserat pentru a asigura expresia ei permite sinteza unei proteine hibride constînd din următoarele fragmente: a) un capăt conținînd șapte aminoacizi ai antranilatsintetazei; b) șase aminoacizi specificați de linkerii de DNA; c) șase rezidii



de fenilalanină din regiunea (T)<sub>10</sub> ai genei FPV; d) șapte aminoacizi din porțiunea 5' netradusă a genei HA; e) 558 de aminoacizi ai proteinei hemaglutininei și ai pre-peptidului său și, final, f) cinci aminoacizi specificați de linkerul *Hind* III de la capătul C-terminal. În total sînt 589 de aminoacizi, care dau naștere unei proteine cu masa moleculară totală de 69000 (Emtage și colab., 1980).

**IX. 4.5.1. Inserția genei hemaglutininei în plasmida pWT121.** Plasmida *pWT121* a fost restrictată cu *Hind* III pentru a fi trecută în forma liniară. Tratamentul ei ulterior cu fosfatază alcalină bacteriană a determinat defosforilarea, adică se îndepărtează capetele 5'-fosfat ale vehiculului. După extracție cu fenol și precipitare cu etanol, plasmida a fost legată cu ajutorul DNA-ligazei *T4* de gena HA. Produsul obținut a fost apoi utilizat pentru transformarea tulpinii *E. coli* K12 HB101. S-au obținut 47 de transformanți Ap<sup>r</sup>, iar dintre aceștia 19 au fost tetraciclino-sensibili (Tc<sup>s</sup>) restul fiind Tc<sup>r</sup>. S-au selecționat 12 colonii (3 Tc<sup>s</sup> și 9 Tc<sup>r</sup>) pentru caracterizare ulterioară. Analiza electroforetică în gel de agaroză a DNA plasmidic tratat cu *Hind* III a arătat că cinci din cele nouă colonii Tc<sup>r</sup> au conținut DNA plasmidial cu inserții, celelalte patru conținând numai plasmida parentală.

Coloniile Tc<sup>r</sup> conținând DNA adițional inclus au fost cultivate și analizate pentru a se determina atât orientarea genei HA incluse în plasmidă, cât și pentru a se testa exprimarea genei. Orientarea genei a fost stabilită prin tratarea plasmidei cu enzime de restricție. Orientarea putea fi spre dreapta (D) sau spre stînga (S), în funcție de direcția transcrierii genei necesară pentru producerea de hemaglutinină. Orientarea D

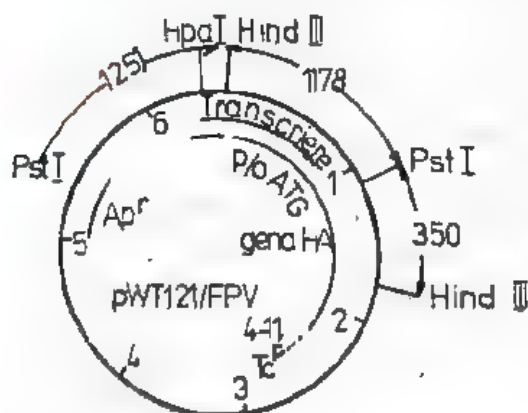


Fig. 84. Structură DNA recombinant *pWT121/FPV<sub>4-11</sub>* format din plasmida *pWT121* și gena hemaglutininei pestei aviare (FPV) (după Emtage și colab., 1980).

(în sensul acelor de ceasornic) față de promotorul *TrpE* era obligatorie pentru ca exprimarea genei HA să poată avea loc. Tratamentul plasmidei denumită *pWT121-FPV<sub>4-11</sub>* (R) (schematic prezentat în fig. 84) cu enzime de restricție a demonstrat că gena HA a virusului pestei aviare FPV a fost inserată în poziția corectă (D), fiind localizată între cele două situsuri specifice *Hind* III.

**IX. 4.5.2. Exprimarea genei hemaglutininei în *E. coli*.** Pentru a stabili exprimarea genei HA, coloniile conținând DNA recombinant de

tipul *pWT121-FPV<sub>4-11</sub>* cu gena HA inclusă în plasmidă au fost analizate prin metoda imunologică în fază solidă. În acest scop, coloniile crescute individual au fost colectate și lizate cu lizozim și Triton X-100. Secvențele de HA prezente au fost legate de un tub de polistiren acoperit IgG specific pentru HA din pesta aviară. Antigenul legat a fost detectat prin incubare cu <sup>125</sup>I-antiFPV-HA.

Din datele imunologice obținute s-a calculat cantitatea absolută de proteină asemănătoare hemaglutininei, produsă de bacterie. Pe baza randamentului maxim de 60 ng per 50/μl de lizat bacterian și a concentrației în proteină de 160 μg/ml s-a estimat că hemaglutinina reprezintă 0,75% din proteina totală. Aceasta înseamnă că proteina cu masa moleculară de 81000 (deci hemaglutinina) constituie 2—3% din totalul proteinelor sintetizate.

## IX.5. DNA recombinant conținând gena interferonului

### IX.5.1. Generalități. Definiție

În momentul de față interferonii sînt agenții antivirali (și chiar antitumorali) cei mai puternici care există, motiv pentru care producerea lor a devenit un obiectiv principal al industriei de medicamente. Stewart și colab. (1980) definesc interferonul ca „o proteină care exercită activitate antivirală nespecifică cel puțin în celulele omoloage, prin procese metabolice celulare care implică atît sinteză de RNA, cît și sinteză de proteine”. Din această definiție, mai degrabă funcțională decît structurală, rezultă că activitatea interferonului nu este limitată la o singură specie moleculară. În general, se consideră că interferonii sînt glicoproteine care se sintetizează atunci cînd celulele sînt stimulate pe diferite căi, virusurile fiind inductorii naturali cei mai importanți. Fiecare specie de animal sintetizează interferonii proprii, în forme moleculare specifice. Această specificitate de producere a interferonului atrage după sine ca utilizarea lui în tratamentul diferitelor maladii să fie restrînsă numai la specia de organism care îl produce. În consecință, în scopuri clinice, pentru om se poate folosi numai interferon produs de celule umane, ceea ce implică cultivarea și menținerea unui mare număr de celule umane producătoare de interferon. După cum se va arăta ulterior tehnologia DNA recombinant a oferit însă posibilitatea producerii de interferon uman chiar în celula bacteriană.

### IX.5.2. Clasificarea interferonilor umani (Hu-IFN)

Avalanșa de informații din domeniul interferonilor a adus noi și noi precizări în ceea ce privește structura și proprietățile lor. În consecință, asistăm la modificarea continuă a clasificării lor. De exemplu,



anul trecut (1980), Stewart și colab. au împărțit interferonii umani în trei grupe principale:  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ . În același an însă, dar câteva luni mai târziu, a apărut lucrarea lui Streuli, Nagata și Weissmann, care arată că la om există cel puțin trei tipuri de interferon  $\alpha$  și anume: Hu-IFN $\alpha_1$ , Hu-IFN $\alpha_2$  și Hu-IFN $\alpha_3$ . Mai mult chiar, ei precizează că studiul genomului DNA pune în evidență prezența a cel puțin opt gene implicate în sinteza interferonilor. Este deci posibil ca, în curînd, să se descrie și caracteristicile altor tipuri de interferoni umani, iar clasificarea actuală să fie completată sau chiar revizuită. În cele ce urmează se va încerca respectarea — pe cît posibil — a clasificării lui Stewart și colab. (1980). Astfel, conform acestei clasificări, interferonii produși de leucocitele stimulate de virus (Sendai sau Newcastle) este predominant de tip  $\alpha$ , în timp ce cei produși de celulele limfoblastoide conțin cca 90% tip  $\alpha$  și 10% tip  $\beta$ . Fibroblastele umane produc, în principal sau exclusiv, interferon de tip  $\beta$ .

Atît structural, cît și biologic, interferonii  $\alpha$  și  $\beta$  sînt diferiți. De menționat că, anterior, interferonii  $\alpha$  și  $\beta$  au fost introduși în aceeași categorie, denumită interferon de tip I acido-stabil.

Interferonii de tip  $\gamma$  sau interferonii imuni sînt produși de limfocitele T ca răspuns al acțiunii unor mitogeni sau a unor antigene. Ei sînt serologic distincți de interferonii  $\alpha$  și  $\beta$ . În plus, sînt acido-labili (Johnson și Baron, 1976).

### IX.5.3. Unele proprietăți moleculare ale interferonilor

Interferonii  $\alpha$  și  $\beta$  au masa moleculară mică, în jur de 20.000 daltoni, în timp ce interferonii  $\gamma$  par să fie heterogeni, conținînd și molecule cu masă moleculară ridicată (Goldstein și colab., 1979). Această heterogenitate este determinată, cel puțin în parte, de gradul de glicozilare a moleculelor respective. Ea ar putea să apară în timpul biosintezei sau în etapele ulterioare, ca o consecință a proceselor de degradare. Este posibil ca unul și același tip de polipeptid să fie în mod diferit glicozilat sau să existe diferite specii de polipeptide de interferoni glicozilate în mod specific. Nu este însă exclus ca fiecare dintre aceste procese în parte sau combinația lor să stea la baza heterogenității interferonilor.

Proprietățile fizico-chimice ale interferonilor variază în funcție de sursă (specie animală, tip de celule) și de metoda de inducție. Pentru acest motiv, nu există o metodă universală de purificare a interferonilor. Unii interferoni însă au situsuri pentru interacțiuni hidrofobe, ceea ce a făcut ca acestea să fie frecvent utilizate pentru purificarea interferonilor. Interacțiunile hidrofobe par să fie responsabile de legarea interferonilor de Phenyl-Sepharose CL-4B, ConA-Sepharose, albumin-agaroză, Blue Sepharose CL-6B.



#### IX.5.4. Modul de acțiune a interferonilor (efectul antiviral)

Dianzani și Baron (1977) susțin că interferonul acționează ca agent antiviral la nivelul procesului de traducere a informației genetice. Atașându-se de receptorii specifici de pe suprafața celulei, interferonul induce producerea de enzime celulare care blochează replicarea virală, inhibând în principal traducerea mRNA viral. Acest proces de inhibiție a traducerii are loc la nivelul inițierii sau elongării catenelor polipeptidice și este de natură enzimatică.

Se consideră că intervenția interferonului se produce pe cel puțin trei căi diferite. Prima cale ar fi cea mediată de o protein-kinază indusă de interferon, iar activarea ei are nevoie de prezența unui RNA bicatenar sau numai de unele zone moleculare bicatenare ale unui RNA monocatenar. Odată activată, kinaza fosforilează și prin aceasta inactivează factorul ribozomal de inițiere, cunoscut sub denumirea de IF<sub>2</sub>. Prin inactivarea IF<sub>2</sub> se împiedică formarea complexului de inițiere stabil necesar sintezei proteinelor virale (Samuel, 1979).

A doua cale de acțiune a interferonului la nivelul traducerii ar consta în formarea de acid 2',5'-oligoadenilic de către oligonucleotidsintetază, enzimă indusă specific de interferon (Kerr și Brown, 1978). Formarea acidului 2',5'-oligoadenilic este și ea activată de RNA bicatenar. Odată ce acest acid a fost sintetizat, el activează o endonuclează celulară latentă care degradează mRNA viral și, prin aceasta, sinteza virusului. Acțiunea este selectivă, endonucleaza celulară nu acționează și asupra mRNA celular, care este probabil protejat în complexul poli-ribozomal format cu complexul de inițiere stabil conținând IF<sub>2</sub> activ.

A treia cale pare să se manifeste la nivelul elongației catenei polipeptidice. Interferonul determinând o deficiență la tRNA celular inhibă elongația. Această deficiență pare a fi mediată de către fosforilaza celulară a cărei activitate crescută determină degradarea nucleotidelor terminale ale tRNA (Schmidt și colab., 1979).

După alți autori interferonul ar acționa ca agent antiviral la nivelul transcrierii RNA viral și nu la nivelul traducerii informației sale (Oxman, 1977) sau la nivelul asamblării și eliberării virusului (Friedman, 1978).

De asemenea, s-a stabilit că interferonul are o importanță deosebită ca modulator imun. În anumite condiții s-a observat că interferonul stimulează activitatea naturală a celulelor de apărare organismul (*natural killer activity*), producând și creșterea activității limfocitelor T (Hirsch și Swartz, 1980).

În concluzie, deși interferonii sînt determinanții esențiali ai rezistenței celulare față de infecția virală, încă nu este stabilit dacă efectele clinice ale interferonului sînt modulate prin mecanisme antivirale sau imunologice. Este însă cert că pacienții cu sistem imunitar intact beneficiază de tratamentul cu interferon exogen mai mult decît cei cu sistemul imunitar compromis.

### IX.5.5. Metode convenționale de producere a interferonului

Dintre metodele convenționale cea mai eficientă s-a dovedit a fi cea preconizată de grupul lui Cantell (1973). Ea se bazează pe producerea de interferon de către leucocitele umane (rezultate ca produs secundar la prelucrarea sîngelui de la donatori), infectate cu virus. Metoda este extrem de laborioasă, iar randamentul ei este limitat. Principalele etape ale acestei metode sînt următoarele: se recoltează sîngele, iar leucocitele se separă prin centrifugare. Leucocitele astfel obținute sînt apoi cultivate în condiții speciale, iar producerea de interferon este stimulată prin infectarea lor cu virus Sendai. După concentrări preliminare, prin precipitare cu KSCN, interferonul brut rezultat poate fi utilizat — sub această formă — în clinică. Extracția cu etanol a proteinelor precipitate din preparatul crud și precipitățile fracționate ale proteinelor inerte la pH ridicat au două consecințe: pe de o parte, puritatea interferonului crește, iar pe de altă parte se pierde parțial din activitatea lui. Produsul final conține aproximativ  $10^6$  unități/mg proteină, cu toate că el are gradul de puritate de numai 0,1%. În condiții optime, din 600 ml de sînge recoltat se pot obține aproximativ  $2 \times 10^6$  unități de interferon, folosind ca inductor virusul Sendai. După cum s-a arătat metoda este limitată. Într-un singur an (1976), printr-o organizare metodică, folosind sîngele a 65 000 de donatori, s-a reușit obținerea doar a  $10^3$  megaunități (o megaunitate are  $10^6$  unități) de interferon crud (Cantell și Strander, 1977). Producerea interferonului prin metoda lui Cantell a avut însă un rol esențial pentru promovarea cercetărilor clinice și, în special, a acelor care au fundamentat utilizarea lui în tratamentul unor forme de cancer.

Într-o variantă mai nouă, prepararea totală a interferonului din leucocite se face prin precipitarea la pH 4,5 cu KSCN, urmată de dializă, gel-filtrare și cromatografie pe coloană de cupru chelat, Blue Dextran-Sephareose, Sephareose cuplată cu anticorpi (Berg și Heron, 1979). Purificarea conduce la un interferon de tip Hu-IFN $\alpha_1$ , cu activitatea specifică de  $2 \times 10^9$  unități/mg proteină, iar randamentul este de 50%. Același tip de interferon a fost preparat și printr-o metodă mai simplă, bazată tot pe precipitarea în mediu acid cu KSCN, urmată numai de două etape adiționale: una de cromatografie pe Sephareose cuplată cu anticorpi și a doua de gel-filtrare. Activitatea interferonului astfel obținut este mai mică ( $1,1 \times 10^7$  unități/mg proteină), dar randamentul este de 100% (Törmä și Pauker, 1976).

Producerea interferonului  $\beta$  se realizează în culturi de fibroblaste umane normale. Ca inductor de interferon se utilizează molecula de RNA bicatenar; tratamentul fibroblastelor cu un complex format din acid poliribinozinic și acid poliribocitidilic — poli(rI):poli(rC) — determină sinteza unor cantități apreciabile de interferon (Havell și Vilcek, 1974). Cu toate că randamentul metodei crește foarte mult dacă celulele



sînt tratate suplimentar cu actinomicină *D* și cicloheximidă, metoda este dezavantajată de faptul că fibroblastele nu pot fi cultivate în suspensie, ci doar atașate de particule de dextran substituit. În plus, metoda are și neajunsul că interferonul generat în acest sistem este mai puțin stabil decît cel sintetizat de leucocite.

Cea mai bună metodă de purificare a interferonului  $\beta$  pare să fie cea preconizată de Okamura și colab. (1980). Ea implică precipitarea cu sulfat de amoniu, trecerea prin filtre de sticlă cu pori calibrați, cromatografie pe carboximetil-celuloză, cromatografie pe coloană de Sepharose cuplată cu anticorpi și electroforeză preparativă în gel de poliacrilamidă, în prezență de dodecilsulfat. Activitatea specifică este, în acest caz, de  $2 \times 10^8$  unități/mg proteină, iar randamentul de 31%.

Celulele transformate derivate din limfocite (linii celulare limfoblastoide), avînd avantajul de a putea fi cultivate nedefinit în suspensie, sînt și ele bune producătoare de interferon. Interferonul astfel produs are practic aceleași proprietăți fizico-chimice și biologice ca și interferonul obținut din leucocite (Havell și colab., 1978). Randamentul producerii interferonului pe această cale este considerat a fi destul de bun. Astfel,  $10^6$  celule din linia Namalwa sintetizează 0,01—0,05 megaunități de interferon. De menționat că interferonul obținut în acest mod este un amestec de IFN  $\alpha$  și IFN  $\beta$ .

Recent, Fanconnier și Ruffout (1980) preconizează obținerea interferonului în culturi celulare de splină umană, infectate cu virus Sendai ca stimulator. Metoda este foarte simplă și randamentul ei pare a fi mult mai bun decît cel al metodei lui Cantell. Autorii estimează că o singură splină umană poate produce o cantitate de interferon egală cu aceea rezultată din 200 de prize de sînge. Inconvenientul major al metodei constă în dependența ei de accidente rutiere, care „furnizează” de fapt splina umană necesară obținerii substratului celular.

### IX.5.6. Purificarea interferonului

Înțelegerea la nivel molecular a numeroaselor fenomene controlate de către interferon nu poate fi realizată pînă cînd nu se va stabili structura primară și secundară a interferonului. Pînă în prezent s-au realizat unele progrese în acest domeniu, în principal datorită faptului că ele au fost condiționate de metodele de producere a interferonului, amintite anterior, care nu au fost capabile să ofere cantități suficiente de interferon cu gradul de puritate cerut de astfel de analize. Cantitățile de ordinul a cîtorva micrograme de interferon din fibroblaste umane (Knight, 1976), interferon de șoarece (Knight, 1975) sau din leucocite umane (Rubinstein și colab., 1979), puteau fi utilizate doar pentru a se obține informații structurale limitate.



Problema este pe cale de a fi definitiv rezolvată. Knight și colab. (1980) au găsit o metodă simplă capabilă să ofere interferon pur, necesar cercetărilor de mare finețe privind stabilirea structurii sale primare și secundare. Conform metodei preconizate, purificarea interferonului din fibroblastele umane se realizează în două etape. În prima etapă se utilizează cromatografia de afinitate (Blue Sepharose — sefaroza albastră — reține selectiv interferonul), iar în a doua etapă purificarea se desăvârșește cu ajutorul electroforezei preparative în gel de poliacrilamidă. Metoda are mari șanse de a fi generalizată pentru purificarea și a altor tipuri de interferon. Este însă posibil ca ea să rămână utilă mai ales pentru producerea de interferoni puri necesari studiilor de structură și să fie mai puțin utilă pentru producerea pe scară industrială a interferonului, întrucât cerințele actuale de interferon sînt extrem de mari și îi depășesc posibilitățile. Totuși, importanța metodei rămîne majoră, pentru că, de la descoperirea interferonului, purificarea și caracterizarea lui chimică au fost dezideratele principale ale cercetărilor din domeniu, iar celelalte metode nu au fost capabile să producă interferon în cantități suficiente.

Studiile de structură a interferonilor devenind accesibile, există acum posibilitatea de a compara între ei interferonii produși de diferite specii de animale, de a cunoaște mecanismul lor de acțiune, și — ceea ce este extrem de important — se deschide calea sintezei lor chimice.

### IX.5.7. Structura primară a unor interferoni

Cunoașterea structurii primare a interferonilor prezintă importanță pentru cel puțin trei motive. În primul rînd, pentru procesul fundamental al cunoașterii și descifrării structurii unei substanțe biologice activă deosebit de importantă, avînd efect antiviral (și antitumoral) remarcabil. Această cunoaștere va permite stabilirea exactă a substratului său chimic și a mecanismului de acțiune.

În al doilea rînd, pentru posibilitatea pe care o oferă realizării sintezei sale chimice. Întrucît sinteza chimică a altor proteine biologice active (de exemplu, insulina) a avut mai mult un rol științific fundamental — fiind considerată, în afara unei performanțe remarcabile, ca o dovadă incontestabilă a structurii substanței respective — decît unul practic, dat fiind că prețul de cost al produsului sintetizat chimic este mult mai ridicat decît al produsului extras, este de așteptat ca și în cazul interferonului situația să fie aceeași, adică producția lui pe scară industrială să nu se facă pe bază de sinteză chimică.

În al treilea rînd, în sfîrșit, cunoașterea structurii primare a interferonului este importantă pentru posibilitatea pe care o oferă realizării sintezei genei care controlează producerea de interferon. Odată cunoscută secvența aminoacizilor din această macromoleculă, se poate realiza

proiectarea și sinteza polinucleotidului corespunzător genei interferonului. Trebuie subliniat că această sinteză este mult mai ușor de realizat decât sinteza chimică a interferonului, deoarece metodele existente astăzi pentru sinteza deoxiribonucleotidelor sînt mult mai eficiente decât cele pentru sinteza polipeptidelor.

Anul 1980 a fost deosebit de bogat în rezultate privind structura primară a interferonilor. Astfel, Mantei și colab. (1980) au determinat secvența totală a aminoacizilor interferonului uman  $\alpha_1$ , Taniguchi și colab. (1980) a interferonului uman  $\beta$ , iar Streuli, Nagata și Weissmann (1980) — a interferonului  $\alpha_2$ . În plus, Taira și colab. (1980) au determinat parțial structura interferonilor A și C de șoarece. O parte dintre aceste date sînt prezentate în tabelul 17, pentru comparația secvențelor, a asemănărilor și deosebirilor structurale dintre cei trei interferoni. Din tabel rezultă că între interferonii umani există mai degrabă deosebiri, decât identități structurale. O oarecare asemănare se găsește doar în regiunea moleculară cuprinsă între reziduiile 130 și 150. Nu este exclus însă ca părțile comune să conțină tocmai zonele active ale interferonilor. Este interesant de remarcat că, în ciuda deosebirilor de secvențe, cei trei interferoni au numărul de aminoacizi aproape identic: IFN  $\alpha_1$  și IFN  $\beta$  au 166 de aminoacizi, iar IFN  $\alpha_2$  are 165 de aminoacizi.

#### IX.5.8. Producerea interferonului prin tehnologia DNA recombinant

Teoretic, producerea interferonului prin tehnologia DNA recombinant se poate realiza prin trei variante. Prima variantă constă în izolarea genei pentru interferon cu ajutorul enzimelor de restricție și inserarea ei într-un vehicul care să o multiplice și să o exprime într-un sistem celular adecvat. Această variantă nu poate fi aplicată însă în practică, deoarece localizarea și izolarea genei pentru interferon nu este încă posibilă.

A doua variantă constă în sinteza chimică a genei interferonului, urmată de inserarea ei în vehicul, la fel ca și în cazul discutat mai sus. Întrucît în momentul de față există o metodă adecvată pentru obținere de interferon pur (Knight și colab., 1980), care este capabilă să furnizeze cantitățile necesare de interferon pentru analizele de secvență a aminoacizilor, se poate estima că în aproximativ un an structura primară a interferonilor și — implicit — structura genelor să fie cunoscută. Odată ce structura genei va fi descifrată, sinteza ei rămîne o problemă relativ ușor de realizat, ținînd cont de progresele remarcabile

Comparația secvențelor de aminoacizi\* a trei interferoni umani diferiți

Hu IFN $\alpha_1$	10	20	30	40
Hu IFN $\alpha_2$	CDLPETHSLDNRRTLMLLAQM-SRI	SPSSCLMDRHHDFGFPQE		
Hu IFN $\beta$	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQM-RRIS	LFSCCLKDRHHDFGFPQE		
Identitate	MSY NLLGFLQRRSSNFQCQKLLWQLNGR--LE	YCLKDRMNFDPPEE		
	L	CLDR	F	P
		Q		E
Hu IFN $\alpha_1$	50	60	70	80
Hu IFN $\alpha_2$	EFDCNQFQKAPAI	SVLHELIQQIFNLF	TTKDS	AAWDEDLLD
Hu IFN $\beta$	EF--GNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN	LFSTKDS	AAWDETLDD	
Identitate	IKQLQFQKEDAAALTIYEMLQNI	FAIFRQDSS	STGWNETIVE	
	QFQK	E	Q	I
			F	F
				W
				E
Hu IFN $\alpha_1$	90	100	110	120
Hu IFN $\alpha_2$	KFCTELYQQQLNDLEACVMQ	EERVGETPLMNADSI	LAVKKYFR	
Hu IFN	KFYTELYQQQLNDLEACVIQ	GVGVTEPLMKEDSI	LAVRKVFQ	
Identitate	NLLANVYHQINHLKTVLE	EKLEKEDFTRGKLMSS	SLHLKRYYG	
	Y	Q	N	L
				S
				L
				Y
Hu IFN $\alpha_1$	130	140	150	160
Hu IFN $\alpha_2$	RI TLYL TEKKYSPCAWE	VVR	AEIMRSLS	SLSTNLQERLRRKE
Hu IFN $\beta$	RI TLYL KEKKYSPCAWE	VVR	AEIMRSLS	SLSTNLQESLSRKE
Identitate	RI LHYL KAKKEYSHCAWTI	VVR	VEILRN	FI NRLTGVLRL
	RI YL	K	YS	CAW
				VREIR

\* Secvențele sînt scrise folosind notația cu o singură literă recomandată de IUPAC-IUB:

A — alanină; C — cisteină; D — acid aspartic; E — acid glutamic; F — fenilalanină; G — glicină; H — histidină; I — izoleucină; K — leucină; L — leucină; M — metionină; N — asparagină; P — prolină; Q — glutamină; R — arginină; S — serină; T — treonină; V — valină; W — triptofan; Y — tirozină.



obținute cu metoda triesterilor în sinteza altor gene (v. cazul genelor somatostatinei și insulinei).

A treia posibilitate de producere a interferonului prin tehnologia DNA recombinant este sinteza enzimatică a genei interferonului cu ajutorul reverstranscriptazei, folosind ca matriță mRNA specific pentru interferon. Această variantă a fost aplicată în practică, iar în anul 1980 o echipă de cercetători condusă de Weissmann a realizat prima sinteză de interferon într-o celulă bacteriană (Nagata și colab., 1980). Etapele principale ale lucrării sînt redată în continuare.

**IX. 5.8.1. Izolarea mRNA pentru interferon.** Leucocitele umane ( $10^{11}$  celule) au fost mai întîi tratate cu virus Sendai pentru inducerea sintezei de interferon. După cinci ore de la infecția cu virus celulele au fost lizate cu DDS 2%, iar lizatul s-a tratat la pH 9 cu pronază (200  $\mu$ g/ml) timp de o oră la 20°C. Produsul rezultat a fost extras cu fenol timp de 30 minute. Pentru separarea fazelor s-a adăugat cloroform, iar faza apoasă a fost adusă la pH 5,5 cu tampon acetat. Din această fază acizii nucleici totali au fost separați prin precipitare cu alcool. Precipitatul s-a dizolvat în tampon cu pH 7,5 conținînd DDS 0,5 %, iar apoi a fost tratat de trei ori cu fenol. Urmele de fenol din faza apoasă s-au îndepărtat cu ajutorul eterului. În final, mRNA specific interferonului avînd o secvență terminală de poliA, motiv pentru care a fost denumit pe scurt poliA-mRNA, a fost izolat cu ajutorul cromatografiei de afinitate folosind oligo(dT)-celuloză ca substrat. Randamentul a fost de 1,6 mg de poliA-mRNA, iar 1  $\mu$ g a dat naștere la 300 de unități de interferon.

Purificarea suplimentară a poliA-mRNA s-a făcut cu o coloană de Chelex-100 și centrifugare în gradient de sucroză 5—23%. Frațiunile conținînd activitate mesageră pentru interferon au avut coeficientul de sedimentare de 12 S. Din acestea, poli-mRNA s-a recuperat prin trecere pe coloană de oligo(dT).

Poli-mRNA astfel purificat a avut o activitate specifică de aproximativ 10 ori mai mare (1  $\mu$ g a dat naștere la 3 600 de unități de interferon).

**IX. 5.8.2. Sinteza genei interferonului (cDNA pentru poliA-mRNA).** Poli-mRNA pur (48  $\mu$ g), obținut în urma cromatografiei de afinitate și prin ultracentrifugare în gradient de sucroză, a fost utilizat ca matriță pentru sinteza cDNA complementar, sinteza fiind realizată de revers-transcriptază. S-au obținut 10  $\mu$ g de cDNA cu lungimea catenelor de 600—1 000 de nucleotide.

În faza următoare, cDNA a fost convertit de către DNA polimeraza I în cDNA bicatenar, iar apoi a fost tratat cu endonuclează S1 pentru a-i îndepărta zona monocatenară. Detaliile acestei sinteze sînt descrise într-o lucrare aparte (Hoeijmakers și colab., 1980) și nu vor fi prezentate, întrucît ele sînt foarte asemănătoare celor deja descrise la sinteza genei propreinsulinei.

De menționat însă că s-au obținut două preparate de cDNA, A și B: preparatul A a conținut o populație moleculară heterogenă (600 – 1 000 de perechi de baze), iar preparatul B a conținut molecule care au sedimentat mai repede decât markerul de  $^{32}\text{P}$ -DNA conținând 600 perechi de baze.

**IX. 5.8.3. Construirea DNA recombinant conținând gena interferonului.** Ca vehicul de clonare a fost aleasă plasmida  $pBR322$ , având masa moleculară de  $2,6 \times 10^6$  daltoni. Pentru a introduce gena interferonului (cDNA sintetizat) sub formă de pasager, DNA plasmidial  $pBR322$  a fost deschis cu enzima de restricție Pst I, care are situsul specific în regiunea genei  $\text{Ap}^r$ . Pentru a introduce capete coezive la vehicul și la pasager, DNA  $pBR322$  — convertit în formă liniară cu enzima de restricție Pst I — a fost elongat cu rezidii dGMP, în timp ce cDNA a primit în același scop rezidii adiționale de dCMP. Acest artificiu experimental a permis cuplarea corectă a pasagerului la vehicul, iar legarea lor covalentă s-a realizat cu ajutorul DNA-ligazei.

**IX. 5.8.4. Transformarea celulelor de *E. coli*  $\chi$  1776.** DNA recombinant construit din preparatele A și B de cDNA inserate în DNA plasmidial  $pBR322$  a fost utilizat pentru transformarea celulelor de *E. coli*  $\chi$  1776, tulpină special pregătită pentru a asigura protecția biologică în cercetările de inginerie genetică (Curtiss, 1977). Analizele au arătat că preparatul A a dat naștere la  $3,3 \times 10^4$  transformanți  $\text{Tc}^r/\mu\text{g DNA}$ , în timp ce preparatul B a generat  $4 \times 10^4$  transformanți  $\text{Tc}^r/\mu\text{g DNA}$ .

**IX. 5.8.5. Identificarea DNA recombinant în clonele bacteriene.** În scopul identificării DNA recombinant s-au făcut teste de hibridizare și traducere. Coloniile ( $10^4$ ) de *E. coli* transformate s-au inoculat individual în plăci speciale și s-au păstrat în glicerol 20% la  $-20^\circ\text{C}$ . Ulterior, clonele bacteriene s-au inoculat tot individual pe plăci de agar și s-au incubat timp de 24 de ore, iar apoi s-au utilizat pentru obținerea unor culturi din care s-a izolat DNA plasmidial.

cDNA hibrid s-a scindat cu Hind III și s-a amestecat cu poliA-mRNA specific interferonului. Amestecul s-a incubat 4 ore la  $56^\circ\text{C}$  în prezența formamidei, pentru a se produce hibridizare. După incubare soluția s-a trecut peste filtre Millipor, iar RNA s-a recuperat de pe filtru prin încălzirea lui la  $75^\circ\text{C}$  timp de 5 minute în prezența EDTA și DDS. Purificarea RNA s-a făcut prin cromatografie de afinitate pe coloană de oligo(dT), iar concentrarea s-a realizat prin precipitare cu etanol.

În final, RNA purificat și concentrat a fost testat pe oocite de *Xenopus laevis* pentru capacitatea lui de a induce sinteza interferonului (capacitatea de traducere).

Testul de hibridizare și traducere a permis identificarea unui set de colonii conținând DNA recombinant purtător al genei interferonului.



Ele au fost reclonate în tulpina de *E. coli* HB101 și au fost denumite Z-*pBR328*(*Pst*)/*HclF-2h* sau pe scurt *Hif-2h*.

IX. 5.8.6. Unele proprietăți ale DNA recombinant *Hif-2h*. S-a stabilit că gena inserată (pasagerul) din DNA recombinant *Hif-2h* are lungimea de 910 perechi de baze. Dintre acestea, 23 perechi de baze GC sînt 5'-terminale iar 15 sînt 3'-terminale.

Orientarea genei, determinată prin analiza secvenței nucleotidelor, a arătat că direcția ei de citire coincide cu aceea a genei  $\beta$ -lactamazei. *Hif-2h* dirijează în *E. coli* sinteza unui polipeptid care are activitate autentică de interferon, inducînd în celulele umane starea de rezistență la infecția virală. Polipeptidul este neutralizat de anticorpi antiinterferon de leucocite. Interferonul produs de *E. coli* stimulează, la fel ca și interferonul de leucocite, activitatea izoadenilatsintetazei.

Nu s-a determinat încă dacă interferonul produs de *Hif-2h* are aceeași activitate specifică ca și interferonul produs de leucocite. Se presupune însă că din punct de vedere structural interferonul produs în celula bacteriană este diferit de cel produs în celula umană, el nefiind glicozilat, întrucît celula bacteriană nu are capacitatea de a realiza acest proces. De asemenea, rămîne să se stabilească dacă potențialul clinic al interferonului de *E. coli* este același sau diferit față de cel al interferonului de leucocite umane.

S-a mai precizat că *Hif-2h* are proprietatea de a induce în *E. coli* sinteza a 1—2 molecule active de interferon per celulă.

## IX.6. Construirea de DNA recombinant conținînd gena ovalbuminei

În ultimul timp consumul proteinelor de origine animală a crescut în mod considerabil pe glob, ca urmare a creșterii vertiginoase a populației. O șansă, alături de multe altele, de a salva în viitor omenirea de „foamea de proteine” o oferă chiar tehnologia DNA recombinant prin realizările sale spectaculoase. Una dintre acestea este sinteza unei „proteine asemănătoare ovalbuminei, de către bacteria *E. coli*, purtătoare a unui DNA recombinant”, publicată în anul 1978 de un grup de cercetători francezi (Mercereau-Puijalon și colab., 1978). Cu toate că ovalbumina sintetizată de bacterie nu a fost total identică cu aceea extrasă din oul de găină, se speră ca ea să poată fi utilă ca aliment artificial pentru hrana unor animale. Perfecționarea ulterioară a tehnologiei va permite fără îndoială să se îmbunătățească calitatea ovalbuminei fabricată de către bacterie, astfel ca ea să aibă calitățile celei izolate din ou.



Sinteza ovalbuminei prin tehnologia DNA recombinant este prima sinteză a unei proteine mari, al cărei lanț polipeptidic este format din 386 aminoacizi — pentru comparație se precizează că somatostatina conține numai 14, iar insulina 51 aminoacizi. De subliniat că bacteria nou formată rămâne stabilă în timpul multiplicării și că nu are tendința de a elimina „greșă” de DNA străin introdusă în mod artificial, ceea ce deschide calea utilizării largi a bacteriilor pentru producerea de proteine de interes alimentar și industrial.

Ovalbumina este proteina majoră din albușul de ou. Cea din oul de găină — intens studiată — este formată dintr-un singur lanț polipeptidic de 386 aminoacizi, cu o singură punte disulfurică —S—S— și avînd o masă moleculară de aproximativ 46 000 daltoni. Acest lanț polipeptidic trece printr-o serie de modificări post-translaționale, printre care sînt de menționat ruperea primului rest de metionină, N-acetilarea, glicozilarea și fosforilarea unor resturi de aminoacizi, procese care duc la apariția de variante genetice ale ovalbuminei (Fothergill și Fothergill, 1970; Palmiter și colab., 1978; McReynolds și colab., 1977).

Ovalbumina este sintetizată de celulele oviductului, care o secretă pentru a fi incorporată în oul în curs de maturizare. Expresia ei este controlată la nivelul transcrierii de către estrogeni și progesteronă (Palmiter, 1975), la fel ca și pentru celelalte proteine din albușul de ou. Administrarea estradiolului, de exemplu, duce la o mică întîrziere în apariția mRNA pentru ovalbumină (McKnight, 1978). De aceea, este important de înțeles în termeni moleculari cum acționează reglarea hormonală, pentru a putea stimula creșterea cantității de ovalbumină în ou; dealtfel acesta a fost primul mobil care a determinat o analiză de detaliu a genei ovalbuminei. Cunoașterea genei și a mecanismului exprimării ei a permis în ultima vreme obținerea de ovalbumină prin tehnologia DNA recombinant (Mercereau-Puijalon și colab., 1978; Fraser și Bruce, 1978), ceea ce creează noi speranțe de producere de proteine de origine animală.

### IX.6.1. Gena ovalbuminei

După cum au arătat pentru prima dată Breathnach și colab. (1977), structura genei naturale a ovalbuminei este deosebit de complexă, avînd numeroase discontinuități.

Discontinuitatea genei a rezultat din următoarea experiență: DNA celular de găină a fost hidrolizat cu ajutorul enzimelor de restricție, iar fragmentele rezultate au fost separate prin electroforeză în gel de agaroză și analizate în continuare prin hibridizare și autoradiografie. Pentru hibridizare s-a folosit un fragment de DNA de mărime cunoscută — 2 430 perechi de baze — (Humphries și colab., 1977) și care conține cea mai mare parte a DNA bicatenar complementar pentru mRNA

al ovalbuminei, clonat în plasmida *pCR1ov2.1*, cu excepția a 65 nucleotide din regiunea corespunzătoare capătului 5' al mesagerului (Breatnach și colab., 1978). Fragmentul a fost obținut prin purificarea unui produs de digestie a plasmidei recombinante *pCR1ov2.1* cu enzima de restricție Hha I.

Pe baza datelor obținute s-a determinat mărimea fragmentelor de restricție a genei naturale a ovalbuminei și s-a construit harta genetică respectivă. Cu această ocazie s-a observat că harta genei celulare nu se suprapune cu harta cDNA pentru mRNA al ovalbuminei, clonat în plasmidă. Astfel, în timp ce în plasmida *pCR1ov2.1* nu s-a găsit nici un situs de acțiune pentru enzima Eco RI, DNA celular de găină restricțat cu aceeași enzimă dă naștere la patru fragmente polinucleotidice! Aceste fragmente, denumite **a**, **b**, **c** și **d**, au dimensiuni variate, de aproximativ 9,2, 2,4, 1,8 și, respectiv 1,3 kilobaze (Breatnach și colab., 1977).

Rezultatul comparației, paradoxal la prima vedere, s-a interpretat în câteva moduri:

— s-ar putea ca în genom să existe mai multe copii ale genei pentru ovalbumină și/sau

— găinile cu care s-a lucrat erau heterozigote din punct de vedere al genei ovalbuminei.

Interpretarea s-a dovedit însă improprie, deoarece reluarea experiențelor cu găini homozigote a dus la obținerea de rezultate similare, iar datele privind structura genomului de găină au arătat că acesta conține o singură copie a genei pentru ovalbumină.

De asemenea, s-a constatat că numai fragmentul **a** ( $\approx 9,2$  kilobaze) hibridizează cu capătul 3' al mRNA pentru ovalbumină, în timp ce capătul 5' al mRNA hibridizează exclusiv cu **b** ( $\approx 2,4$  kilobaze). În ceea ce privește fragmentele de restricție **c** și **d**, s-a stabilit că ambele hibridizează cu o anumită regiune din mRNA, corespunzătoare zonei din cDNA localizată între centrii de clivare pentru enzimele Hae III și Pst I.

La o concluzie similară au ajuns în mod independent și alți autori cum ar fi Doel și colab. (1977), Weinstock și colab. (1978), Lai și colab. (1978). Asemănarea datelor obținute cu diferite linii de găini, în diferite părți ale lumii, arată că regiunea genei pentru ovalbumină în genomul respectiv este foarte bine conservată și consolidată.

Astfel a fost validată concluzia că gena naturală pentru ovalbumină este discontinuă\*, adică formată prin înlanțuirea („înnodarea”) unor

\* În literatura de specialitate pentru genele de tipul celei a ovalbuminei, adică gene discontinui, se folosește termenul *spliced genes* (*to slice* = a înnoda, a lega).



zone (porțiuni) care se exprimă la transcriere (*exoni*) și zone care nu se pot exprima (*introni*).

**IX. 6.1.1. Organizarea fragmentelor genei celulare.** Datele obținute, prezentate anterior nu au fost totuși suficiente pentru a răspunde la întrebarea: care este organizarea reciprocă a fragmentelor a, b, c, d ale genei celulare?

De precizat că trebuie făcută o distincție clară între „gena celulară” sau „naturală” a ovalbuminei — adică porțiunea din genomul de găină a cărei transcriere și apoi traducere determină exprimarea ovalbuminei ca proteină, și „gena structurală” pentru ovalbumină — adică DNA bicatenar complementar mRNA pentru ovalbumină, obținută *in vitro*. Diferențierea este justificată tocmai de deosebirile existente între ele și care vor fi prezentate în continuare.

Inițial s-a crezut că cele patru fragmente de genă celulară restricțată ar aparține unor cromozomi diferiți, dar analizele efectuate de Mandel și colab. (1978) au adus noi precizări și anume:

— toate fragmentele de DNA rezultate la digestia genei celulare cu *Eco RI* derivă dintr-un fragment de 18 kilobaze, produs în urma digestiei cu *Bam HI*;

— existența fragmentelor c și d reflectă diferența existentă între doi cromozomi heterozigoți;

— în genomul de găină fragmentele au o orientare spre dreapta, din punct de vedere al secvențelor care codifică mRNA pentru ovalbumină, confirmând caracterul „înodat” al genei celulare a ovalbuminei și relevându-i marea complexitate.

Hărțile de restricție construite au fost completate cu date obținute prin analiza la microscopul electronic a hibridizilor realizați între mRNA pentru ovalbumină și cDNA clonat. De exemplu, când s-a lucrat cu fragmentul b s-a constatat o imagine neobișnuită și anume existența a trei bucle de DNA nehibridizat, ceea ce a demonstrat prezența în acel fragment a trei secvențe netranscrise (cel puțin trei) în DNA, secvențe care lipsesc în mRNA (Garapin și colab., 1978). În urma coroborării datelor de acest fel a rezultat că gena celulară este formată din șase introni (Gilbert, 1978), separați de șapte exoni (Mandel și colab., 1978). Tehnicile folosite de autorii menționați nu au permis însă detectarea secvențelor mai mici de 50 nucleotide. Lucrând cu tehnici cu sensibilitate crescută, Dugaiczky și colab. (1979) au pus în evidență o scurtă secvență, care codifică capătul 5'-terminal — lung de 45 nucleotide — al mRNA pentru ovalbumină. În efortul de a determina structura genei celulare s-au clonat numeroase alte fragmente de restricție obținute din DNA



de găină, ceea ce final a permis determinarea integrală a organizării genei naturale a ovalbuminei. Ea s-a dovedit a fi formată din 15 zone de lungimi variabile și anume: opt exoni separați de șapte secvențe de „DNA de intervenție” sau introni (fig. 85). (Dugaiczky și colab., 1979).

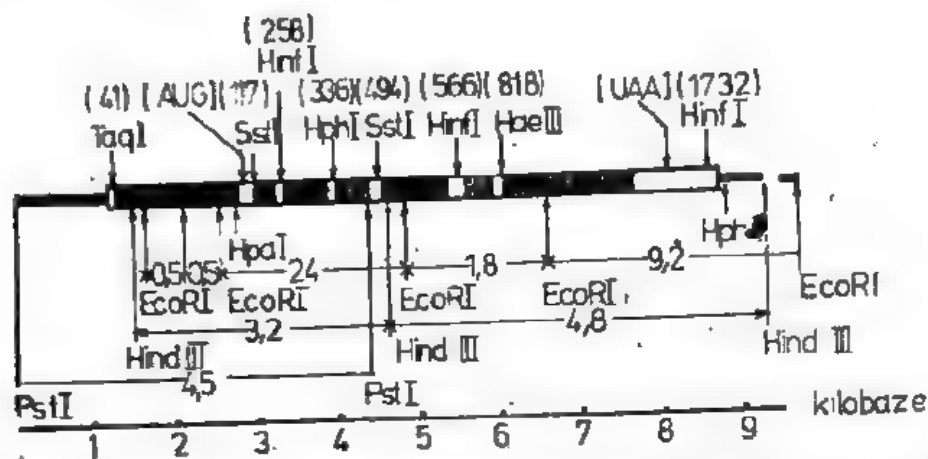


Fig. 85. Harta fizică a genei naturale integrale a ovalbuminei, cu indicarea unor situsuri de restricție mai importante, a codonilor de inițiere și de terminare și a regiunilor alternative exoni-introni (după Dugaiczky și colab., 1979).

**IX. 6.1.2. Probleme legate de structura genei celulare a ovalbuminei.** Structura complexă deosebită a genei pentru ovalbumină, care ilustrează în mod pregnant existența unor diferențe de organizare între celulele eucariote și cele procariote, ridică o serie de probleme. Se pune întrebarea dacă gena este activă ca atare sau suferă modificări în cursul transcrierii.

Oare intronii sînt transcriși într-un pre-mRNA? Structura genei native pentru ovalbumină este compatibilă cu această ipoteză — toate secvențele care codifică mRNA pentru ovalbumină sînt în ordine de dreapta, similar orientate —, dar nu există încă dovezi la fel de ferme de sinteză a pre-mRNA ca în cazul altei gene complexe eucariote și anume a  $\beta$ -globinei (Tilghman și colab., 1978). Totuși s-au detectat molecule de RNA cu o lungime de cca 10 000 nucleotide și care conțin produși de transcriere atît pentru exoni, cît și pentru introni. S-a sugerat că apariția unor astfel de precursori ar implica formarea unor structuri cu perechi de baze între capetele opuse ale produșilor de transcriere a intronilor, pentru a permite aducerea în strînsă proximitate a capetelor produșilor de transcriere a doi exoni vecini, cu formarea unor „bucle” din produșii de transcriere a intronilor (Klessig, 1977).

Dar datele de secvență nu sînt compatibile cu un model atît de simplu. S-ar putea ca în mecanismele de excizie-excludere-legare să aibă un rol important alte tipuri de „împachetare”, mai complicate, ale transcrișilor primari.

S-a remarcat că nici o „frontieră” exon-intron din gena ovalbuminei nu se poate defini în mod neechivoc, din cauza prezenței în aceste zone a unor nucleotide care se repetă (Breathnach și colab., 1978) (v. nucleo-

tidele încadrate, fig. 86). Se pare că datorită lor „înnodarea” genei se poate produce chiar în momentul sintezei ei, deși ar putea lua naștere și unele ambiguități. Breathnach și colab. (1978) au arătat că la capătul 5'-terminal al intronilor apare cu frecvență ridicată dinucleotidul GT, iar la capătul 3'-terminal se remarcă AG.

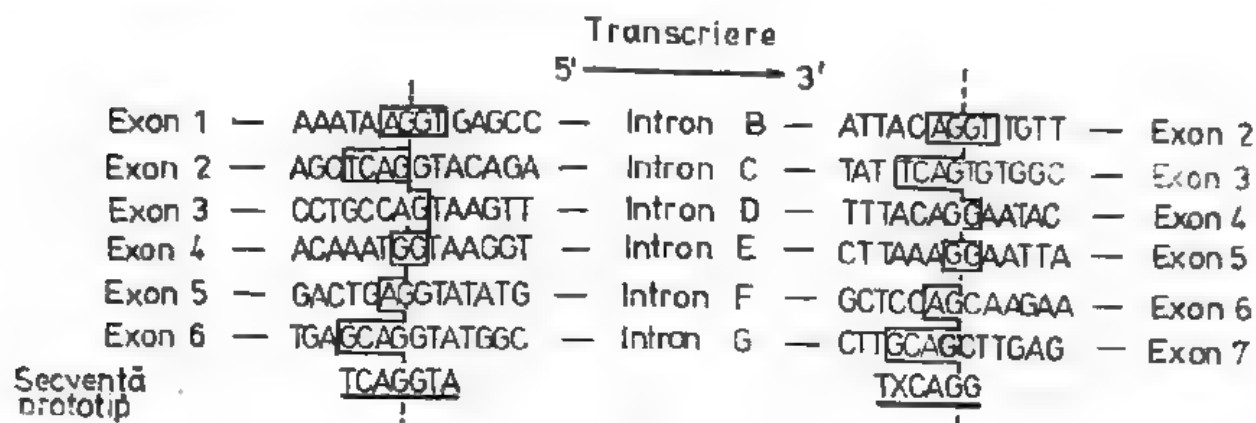


Fig. 86. Comparația secvențelor de DNA la frontierele exoni-introni ale genei naturale a ovalbuminei. Nucleotidele încadrate prezintă acele secvențe care se repetă și permit „înnodarea” în diferite moduri. Linia verticală întreruptă arată modul în care excizia și legarea („splicing”-ul) ar putea avea loc (după Breathnach și colab., 1978).

Comparînd datele de secvență pentru gena celulară a ovalbuminei cu alte secvențe din zona joncțiunilor intron-extron ale altor gene virale (genele timpurii și târzii ale SV40) sau gene de eucariote superioare (genele  $\beta$ -globinei de iepure și de șoarece, gena lanțului ușor al imunoglobulinelor  $\lambda$ I și  $\lambda$ II), autorii citați arată că ele pot deriva dintr-o aceeași secvență prototip și că punctele de joncțiune ale intronilor pot fi și în acest caz definite prin prezența dinucleotidelor 5'-GT și 3'-AG. Aceste asemănări sugerează că procesul transcrierii primare a tuturor acestor gene ar avea loc printr-un mecanism asemănător.

O altă problemă ridicată de structura atît de complexă a genei naturale a ovalbuminei a fost cea a repetabilității în genom a secvențelor de intervenție. Cercetările lui Garapin și colab. (1978) efectuate în acest scop nu au reușit să evidențieze prezența unor secvențe repetitive de acest tip.

**IX. 6.1.3. Rolul intronilor.** S-a pus întrebarea de ce gena unui organism eucariot superior conține introni? Descoperirea acestor structuri complexe a dat naștere la numeroase speculații (Gilbert, 1978; Blake, 1978). În acest context, s-a emis ipoteza că genele discontinui ar putea să fie replica eucariotă a operonului bacterian. Totodată s-a remarcat că același pre-mRNA poate fi tăiat în diverse moduri, formînd diferiți mRNA și ca atare să genereze diferite polipeptide. Este interesant de observat că majoritatea genelor care codifică proteinele predom-

minante din ou — conalbumină, ovomucoid, lizozim — au, la fel ca și ovalbumina, o structură discontinuă.

### IX.6.2. mRNA pentru ovalbumină

mRNA al ovalbuminei predomină în oviductul de găină, unde reprezintă cca 50% din poliA-mRNA total din aceste celule (atunci când sînt stimulate hormonal). Acest fapt permite izolarea sa în formă relativ pură. mRNA pentru ovalbumină are o lungime totală de 1859 nucleotide, a căror secvență totală a fost determinată de McReynolds și colab. (1977 și 1978).

Cele 1 859 nucleotide sînt repartizate astfel: 64 nucleotide alcătuiesc capătul 5'-terminal care nu codifică nimic, apoi urmează regiunea de codificare de 1158 nucleotide lungime și capătul 3'-terminal, zonă în care se află alte 627 nucleotide care nu codifică nimic. Zona tradusă este continuă, dar în lumina celor expuse despre genele discontinui, „înnodate”, nu se știe exact dacă provine dintr-un pre-mRNA mai lung, prin excizia segmentelor complementare corespunzătoare intro-urilor.

La fel ca și unii mRNA virali (Sambrook, 1977; Chambon, 1978) mRNA pentru ovalbumină prezintă o așa-numită secvență conducătoare de dirijare \* (*leader*) lungă de 45 nucleotide.

### IX.6.3. Etapele construirii DNA recombinant pentru ovalbumină

Cu toate că tehnologia DNA recombinant permite introducerea și clonarea în *E. coli* a genelor străine de diverse origini, exprimarea acestora în mediul bacterian nu este, pentru moment, perfect documentată teoretic. Unele gene, izolate din celule eucariote inferioare (drojdii, *Neurospora crassa*, *Drosophila*), au fost exprimate de către *E. coli* în mod spontan (Struhl și colab., 1977; Rambach și Hogness, 1977; Clarke și Carbon, 1978).

În ceea ce privește exprimarea în bacterii a genelor celulelor eucariote superioare, lucrurile sînt ceva mai complicate, dar transcrierea mesajului eucariot a putut fi forțată în mod eficient prin integrarea secvențelor de gene în bacterie. De exemplu, în acest mod s-a construit o tulpină de *E. coli* capabilă să producă un hormon polipeptidic cu moleculă mică — somatostatina (Itakura și colab., 1977) — sub forma unei proteine-hibrid. Întrucît somatostatina nu conține metionină (care o leagă

\* Termenul de „conducător” (*leader*) corespunde unei secvențe de DNA separată fizic de secvențele care codifică proteina.



de o proteină bacteriană), labilă în anumite condiții, hormonul a putut fi eliberat prin tratament cu BrCN. Dar, cele mai multe polipeptide conțin metionină, astfel încât metoda prezentată are o valabilitate restrânsă.

Tehnologia DNA recombinant s-a dovedit a avea și alte aplicații — în afara sintezei unor polipeptide mici, de tipul somatostatinei, codificate de gene sintetizate chimic — cum ar fi sinteza unor molecule proteice mari — de tipul ovalbuminei — de interes fundamental sau aplicativ. Descoperirea că cel puțin unele gene de eucariote sînt discontinui (Breathnach și colab., 1977; Brack și Tonegawa, 1977 etc.) a făcut la început puțin probabilă posibilitatea ca aceste gene, izolate ca atare din genom, să se poată exprima în *E. coli*. În acest caz, strategia adoptată pentru exprimarea în *E. coli* a genelor respective — de exemplu pentru ovalbumină, realizată pentru prima oară de către Mercereau-Pujalon și colab. (1978) și, aproape simultan, de către Fraser și Bruce (1978) — s-a bazat pe următoarea secvență de evenimente:

- extracția mRNA specific;
- sinteza enzimatică a cDNA, deci obținerea unei gene sintetice (eventual, purificată prin clonare);
- legarea secvenței cDNA bicatenar construit la o genă bacteriană, astfel încât secvența eucariotă să fie citită în mod corespunzător;
- clonarea în *E. coli*.

Pentru obținerea ovalbuminei prin tehnologia DNA recombinant s-a lucrat în condiții de protecție fizică P2 și folosind gazde de tip EK1, în modul pe care-l vom prezenta în continuare.

**IX. 6.3.1. Clonarea copiilor de DNA a mRNA al ovalbuminei.** Întrucît mRNA al ovalbuminei reprezintă aproximativ 50% din mRNA extras din celulele oviductului de găină stimulat hormonal cu estrogeni, el poate fi purificat cu ușurință. mRNA extras a fost copiat enzimatic la DNA complementar (cu reverstranscriptază); gena structurală sintetică obținută pentru ovalbumină a fost apoi clonată în *E. coli*. Clonarea s-a dovedit deosebit de necesară, deoarece:

- în acest fel purificarea mesagerului pentru ovalbumină nu trebuie să fie foarte înaintată și deci nu se reia de prea multe ori;
- odată clonată secvența ovalbuminei devine liberă de eventualele contaminanți existenți în preparatele de mRNA;
- plasmida recombinantă poate fi obținută în cantități mari;
- posibilitatea de obținere a secvențelor pure de ovalbumină, sub forma cDNA bicatenar, permite o precisă analiză de restricție, precum și determinarea secvenței DNA.

Primul transcript, aproape integral, al mRNA de ovalbumină, din care lipsesc primele 14 nucleotide de la capătul 5' al mRNA (mRNA al ovalbuminei are 1859 nucleotide) a fost obținut de Humphries și colab., (1977) sub forma plasmidei pCR10v2.1. Independent, McReynolds și

colab. (1978) au obținut un alt transcript esențial al mRNA al ovalbuminei din care lipsesc numai primele 12 nucleotide de la capătul 5' terminal, denumit plasmida *pOV230*.

Din aceste plasmide recombinante a fost recuperată gena ovalbuminei, prin hidroliza cu endonucleaze de restricție.

**IX. 6.3.2. Construirea plasmidei lac-ova pUC1001.** Gena structurală a ovalbuminei, clonată și purificată în modul anterior arătat, a fost inserată într-o nouă plasmidă, în vederea construirii DNA recombinant pentru ovalbumină, capabil să se exprime într-o celulă bacteriană.

Cele două colective de cercetători care au realizat pentru prima dată această performanță au folosit pentru integrare două vehicule diferite: plasmida *pOMP1*, cu o lungime de 7,1 kilobaze, derivată de la *pBR322* (Mércereau-Puijalon și colab., 1978) și plasmida *pOP203*, derivată de la *pMB9* (Fraser și Bruce, 1978).

În continuare se redă schema de lucru folosită de către Fraser și Bruce (1978) (fig. 87), pentru construirea plasmidei recombinante pentru ovalbumină *pUC1001*.

Plasmida *pOP203* a fost scindată cu *Eco RI*, apoi molecula liniară s-a tratat cu fosfatază alcalină, pentru îndepărtarea grupărilor 5'-fosfat,

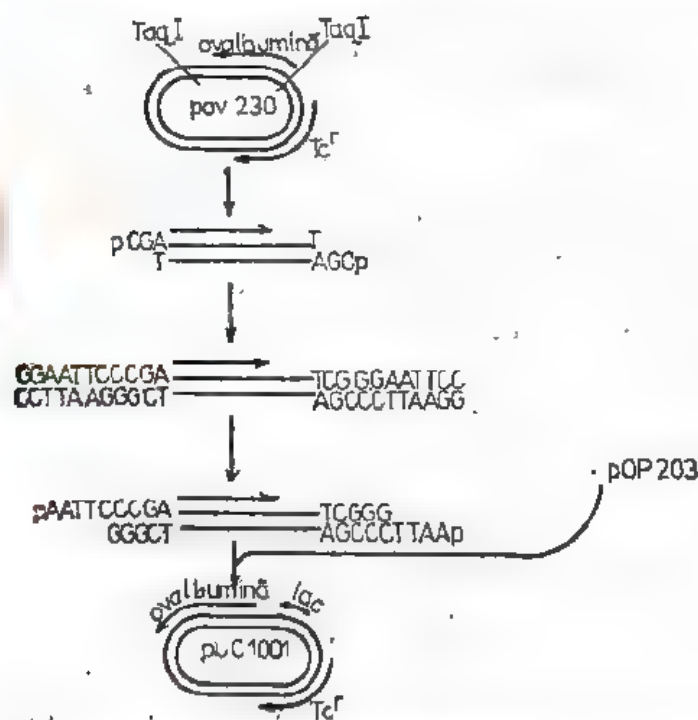


Fig. 87. Etapele parcurse pentru legarea elementelor operonului *lac* la gena ovalbuminei, cu obținerea plasmidei *pUC1001* (după Fraser și Bruce, 1978).

în scopul evitării recircularizării vehiculului în cursul legării. În paralel, s-a prelucrat plasmida *pOV230*, care are în constituția sa gena structurală pentru ovalbumină; aceasta conține un singur situs pentru endonucleaza de restricție *Taq I*, situat la 25 nucleotide de capătul 5' al inițiatorului AUG pentru ovalbumină. Fuzionarea în acest loc a regiunilor de control bacterian din *pOP203* a permis exprimarea întregii gene

pentru ovalbumină. În afara genei pentru ovalbumină, la aproximativ 250 nucleotide distanță, *pOV230* mai are un situs specific pentru Taq I.

Secvențele regiunii de control *lac* în *pOP203* și ale genei ovalbuminei inserate în *pOV230* se cunosc, ceea ce a ajutat la legarea DNA *lac* și a cDNA bicatenar pentru ovalbumină de așa manieră, încît la traducere să se mențină orientarea normală, considerînd că sinteza proteică începe de la codonul de inițiere pentru  $\beta$ -galactozidază. Dintre căile posibile care pot asigura legarea în fază a vehiculului și a pasagerului, Fraser și Bruce (1978) au ales următoarea: secvențele monocatenare de la capetele coezive ale tăieturii *pOV230* cu Taq I au fost „umplute” (complementarizate) cu ajutorul DNA polimerazei *T4* și apoi legate cu linkeri (octameri sintetici) pentru a forma centrul pentru *Eco RI*; în continuare s-a făcut hidroliza cu *Eco RI*, cu apariția de capete coezive, cu extensii 5'. Pentru purificarea fragmentului de interes s-a procedat la o gel filtrare.

După eluția de pe gel, fragmentul de DNA *pOV230* a fost legat, în prezența DNA-ligazei *T4*, cu vehiculul plasmidei *pOP203*, tratat cu fosfatază. În acest mod s-a obținut plasmida recombinantă *pUC1001*, care conține inserată gena structurală a ovalbuminei.

DNA legat s-a folosit la transformarea *E. coli* HB101, selectîndu-se colonii  $Tc^r$ . Transformanții au fost testați *in situ* pentru producerea ovalbuminei, folosindu-se metode radioimunologice. Coloniile s-au lizat cu lizozim și sarcozil după creșterea pe agar cu ser antiovalbumină, izopropiltiogalactozidază și tetraciclină. În jurul unor colonii s-au format inele de precipitare, ușor de decelat, ceea ce a arătat că ele produc cantități apreciabile de ovalbumină.

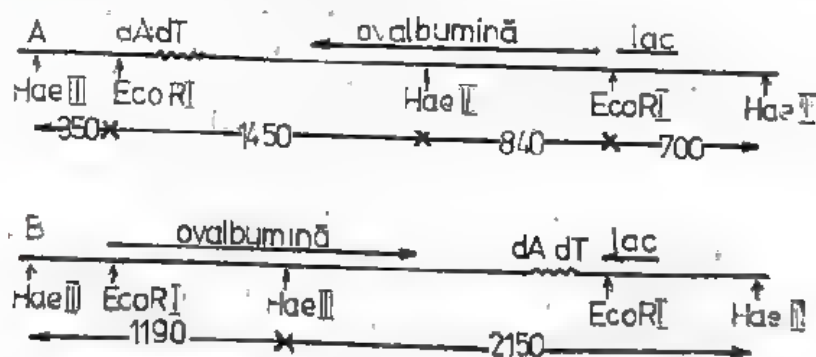


Fig. 88. Hărțile de digestie cu unele endonucleaze de restricție a plasmidelor conținînd gena ovalbuminei, cu prezentarea celor două orientări posibile ale acestei gene față de elementele controlului *lac* (după Fraser și Bruce, 1978).

Pentru o verificare suplimentară s-a procedat la o digestie cu enzime de restricție (*Hae III*, *Eco RI*) a DNA *pUC1001* și analizarea prin electroforeză pe gel de agaroză a fragmentelor rezultate. Legarea pasagerului de vehicul putea duce la două moduri de legare (fig. 88):

— forma A, care prin transcriere și traducere dă naștere la ovalbumină;



— forma B, care nu duce la exprimarea ovalbuminei.  
De aici concluzia că legarea s-a făcut în forma A.

IX. 6.3.3. Exprimarea în *E. coli* a genei structurale a ovalbuminei. Lucrându-se în imunodifuzie cu ovalbumină standard, s-a stabilit că aproximativ 1,35—1,6% din proteina celulară din celulele de *E. coli* clonate este reprezentată de către ovalbumină, după cum a reieșit și din colorarea cu Coomassie Brilliant blue a electroforezelor pe gel de poli-acrilamidă cu DDS 0,1% în condiții reducătoare, a proteinelor celulare din bacterii în care s-a exprimat gena structurală a ovalbuminei.

În absența izopropilgalactozidului, randamentul de ovalbumină a scăzut cu aproximativ 50%, ceea ce a dovedit că într-adevăr sinteza acestei proteine eucariote s-a aflat sub control *lac*.

Pentru a determina dacă bacteria secretă ovalbumină în spațiul periplasmatic, *E. coli* cu plasmida *pUC1001* au fost crescute pe medii cu izopropiltiogalactozid și cu tetraciclină. Celulele au fost aduse la forma de protoplaști prin tratare cu lizozim și EDTA și apoi s-au centrifugat. Supernatantul de la ultracentrifugare a conținut proteinele periplasmatic, iar sedimentul — protoplaști. Ca marker pentru proteinele nesecretate s-a folosit  $\beta$ -galactozidază, iar pentru proteinele periplasmatic — fosfataza alcalină. Mai mult de 96% din activitatea  $\beta$ -galactozidazei s-a regăsit în protoplaști, restul — sub 4% — impurificând periplasma. Mai puțin de 75% din activitatea fosfatazei alcaline s-a evidențiat în periplasmă, ceea ce a sugerat că unele proteine periplasmatic nu sînt eliberate în supernatant. S-a stabilit prin această metodă că ovalbumina este aproape la fel repartizată în mediul periplasmatic și în protoplaști, ceea ce arată că ea este activ secretată prin membrana *E. coli*, deși nu în aceeași măsură ca fosfataza alcalină.

De menționat că cele două tipuri de ovalbumină — secretată și nesecretată — au avut aceeași masă moleculară (determinată prin electroforeză pe gel de poli-acrilamidă, în condiții reducătoare).

Rezultate similare în ceea ce privește exprimarea genei structurale a ovalbuminei în *E. coli* au obținut și cercetătorii francezi (Mercereau-Puijalon și colab., 1978). În plus, studiile radioimunologice pe care le-au întreprins au arătat că ovalbumina „fabricată” de către bacterie este lipsită de unul (sau mai multe) din centrii antigenici. Întrucît masa moleculară a „ovalbuminei bacteriene” este asemănătoare cu cea a ovalbuminei native din ou s-a dat credit următoarei explicații: afinitatea centrilor antigenici ai „ovalbuminei bacteriene” pentru anticorpii respectivi este mai mică decît cea a ovalbuminei native originale, deoarece în oviduct albumina suferă o serie de transformări posttranslaționale, care ar putea avea rolul lor în structura determinantilor antigenici. Astfel de modificări nu se produc în mod sigur în *E. coli*. Cantitativizarea ovalbuminei din bacterie a arătat un randament de aproximativ 15 ng de produs pentru  $2,5 \times 10^6$  celule, ceea ce înseamnă aproximativ 90 000 molecule proteice.

Bacteriile *E. coli* în care s-au introdus plasmidele recombinante *pOM2* (Mercereau-Puijalon și colab., 1978) și *pUC1001* (Fraser și Bruce, 1978) s-au dovedit a fi stabile, fără tendința de a-și pierde plasmidele respective. Sinteza ovalbuminei în aceste bacterii, inițiată de promotorul *lac* al plasmidelor *pOM2* și *pUC1001*, a început cu poziția 39—AUG— a  $\beta$ -galactozidazei, ceea ce a făcut ca proteina eucariotă să aibă la un capăt o secvență suplimentară de 18 aminoacizi; această „coadă” dispare însă în cursul secreției, sau prin liză cu proteaze celulare.

Nivelul de 1,5% ovalbumină din totalul de proteine bacteriene este inferior nivelului care poate fi atins teoretic în acest sistem. S-a stabilit că plasmida recombinantă are o multiplicitate de 20—30 copii per celulă (Fraser și Bruce, 1978). Se știa că  $\beta$ -galactozidaza, cu o singură copie de genă per celulă de *E. coli* reprezintă aproximativ 2% din proteinele celulare (Miller, 1972), așa că ovalbumina ar trebui să ajungă — în aceste condiții — la aproximativ 19% din proteinele celulare, iar ea abia atinge un randament sub 10% din cel teoretic.

Unele din explicațiile probabile ar fi cele de mai jos:

- codonii din mRNA al ovalbuminei ar putea avea frecvență simțitor diferită de cea existentă în mesagerii din *E. coli*; astfel, unii codoni (AUC, GUG, CCA, GAC, GAA, GCA) sînt mai des folosiți în gena ovalbuminei decît într-unii bacteriofagi de *E. coli* cu secvență cunoscută, cum ar fi MS2 sau  $\Phi$ X 174 (Sanger și colab., 1977; Efstratiadis și colab., 1977);

- deși nu există încă date suficiente care să permită generalizarea, s-ar putea ca unii din tRNA izoacceptori, necesari pentru traducerea genei ovalbuminei în *E. coli* să aibă o concentrație mai redusă, limitînd sinteza acestei proteine (Fraser și Bruce, 1978). Mercereau-Puijalon și colab. (1978) consideră însă că posibila deficiență a *E. coli* în tRNA corespunzători nu ar interfera prea mult cu exprimarea secvenței genei ovalbuminei;

- în cursul exprimării genei pentru ovalbumină ar putea interveni unele procese de degradare proteică a polipeptidului nascent pe polizomi și/sau a polipeptidului matur, eliberat. Datele experimentale înclină către proteoliza polipeptidului nascent.

Prezența la bacterii a unei membrane rigide multistratificate ridică probleme speciale de secreție a proteinelor în mediu: nu se știe dacă aceste proteine străbat straturile respective în mod succesiv sau dacă există regiuni specializate ale membranei citoplasmatică expuse direct exteriorului, prin care proteinele ies în mediul extern.

În plus, segregarea diferitelor proteine între membrana internă și cea externă a bacteriilor Gram-negative prezintă o problemă de morfogeneză a membranei, analoagă celei din celulele eucariote (Davies și Tai, 1980).

Mecanismele de secreție din celulele bacteriene au recunoscut în mod evident — semnalele celulei eucariote (în cazul prezentat, de găină),



cîtă vreme *E. coli* conținînd inclusă gena ovalbuminei pot secreta această proteină (Mercereau-Puijalon și colab., 1978; Fraser și Bruce, 1978).

Biosinteza ovalbuminei în *E. coli*, prin tehnologia DNA recombinant, este primul exemplu de sinteză în celulele bacteriene a unui lanț polipeptidic lung de la eucariote superioare și, de asemenea, primul exemplu de lanț polipeptidic lung sintetizat cu un randament promițător de la un cDNA bicatenar clonat, obținut pe matrița mRNA.

În întregul lor, aceste experimente au demonstrat posibilitatea de manipulare a bacteriilor în scopuri diverse. Datorită conținutului său bine echilibrat în aminoacizi, ovalbumina este utilizată deseori ca standard de valoare nutritivă și se poate imagina că proteina asemănătoare „fabricată” de bacterii, poate servi în scopuri alimentare.

## IX.7. DNA recombinant obținut din operatorul lac și plasmida pMB9

### IX.7.1. Sinteza chimică a operatorului lac

Cu ajutorul metodei fosfotriesterilor descrisă de grupul lui Itakura s-au sintetizat patru oligonucleotide, dintre care două au conținut 11 nucleotide (I și IV), iar celelalte două 15 nucleotide (II și III) care

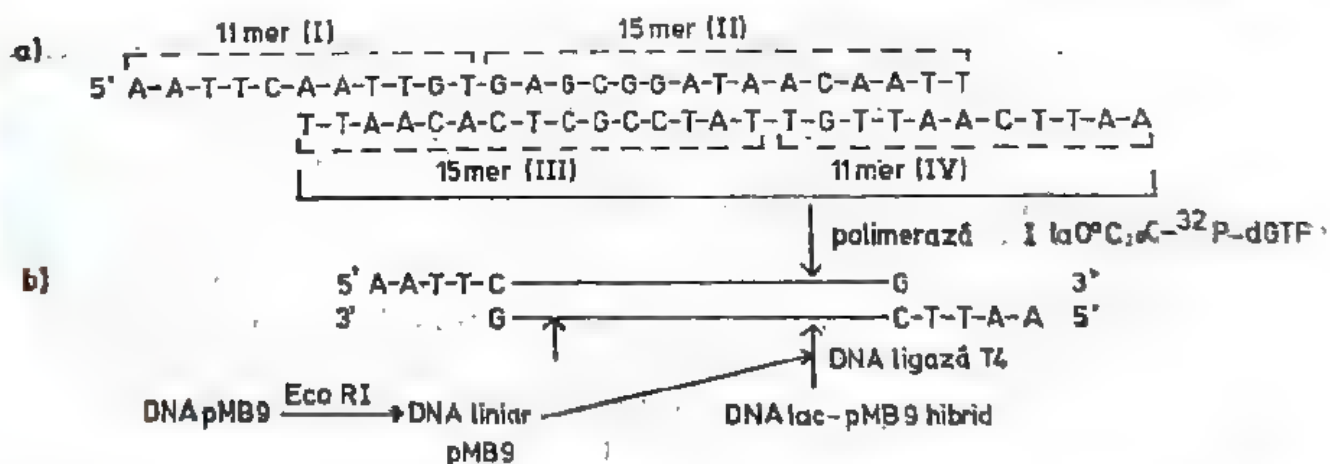


Fig. 89. Schema modului în care a fost construit DNA recombinant purtător al operatorului lac.

au fost legate între ele cu DNA-ligază T4 în așa fel încît să constituie împreună atît secvența nucleotidelor operatorului lac, cît și capetele monocatenare coezive similare cu cele generate de enzima de restricție Eco RI (fig. 89).

IX. 7.1.1. Pregătirea operatorului pentru inserție în plasmidă. Operatorului sintetizat conform schemei de mai sus îi mai trebuie o nucleo-



tidă (G) cu capătul 3' pentru a avea situsul corect al enzimei Eco RI. Pentru a realiza adiția acestei nucleotide, operatorul a fost incubat la 0°C în prezența polimerazei I și a  $^{32}\text{P}$ -dGTP (fig. 66).

**IX. 7.1.2. Pregătirea plasmidei pMB9.** Din forma sa CCI plasmida a fost convertit în formă liniară de către enzima Eco RI. În urma acestui tratament, la plasmidă au apărut și capete coezive de tip Eco RI, capabile de a se lega de capetele operatorului.

Operatorul *lac*, avînd secvența suplimentară monocatenară cu capetele 5'-AATT, a fost amestecat cu forma liniară a plasmidei *pMB9* în proporția molară de 1pM : 3pM. Formarea moleculei hibride a fost realizată prin incubarea amestecului timp de 20 ore la 12,5°C în prezența DNA ligazei T4. DNA recombinant rezultat a fost folosit pentru a transforma celule competente de *E. coli*. Pentru a facilita pătrunderea DNA recombinant în celule, amestecul de celule împreună cu DNA au fost întâi incubate la 0°C timp de 30 min, după care temperatura s-a ridicat la 42°C timp de 2 min. După acest tratament celulele au fost aduse la temperatura lor normală de creștere. Clonele rezultate au fost selecționate și analizate pentru a determina multiplicarea și exprimarea DNA recombinant.

Datele experimentale obținute au dovedit că: a) DNA recombinant s-a multiplicat în unele celule și b) operatorul *lac* incorporat în DNA recombinant s-a exprimat, fapt pus în evidență prin producerea de  $\beta$ -galactozidază.

*DNA recombinant conținînd gena hormonului paratiroidian bovin* Kronenberg și colab. (1979) au clonat în *E. coli* gena hormonului paratiroidian bovin. DNA recombinant s-a construit din plasmida *pBR322* și cDNA sintetizat cu ajutorul mRNA specific hormonului preproparatiroidian. Gena a fost inserată la locul de scindare a plasmidei cu enzima de restricție Pst I. Realizarea este deosebit de importantă întrucît acest hormon are un rol esențial în reglarea concentrației de  $\text{Ca}^{2+}$  la nivelul sîngelui care, la rîndul ei, dirijează secreția de hormon paratiroidian.

*DNA recombinant conținînd gena  $\delta$ -cristalinului.*  $\delta$  cristalinul de pui este prima proteină care apare în lentila ochilor embrionilor de pui. Recombinantul denumit *p $\delta$ Cr-2* s-a construit din plasmida *pBR322* și gena  $\delta$  cristalinului sintetizată enzimatic pe matrița mRNA izolat din celulele lentilei ochilor embrionilor de pui, în vîrstă de 15 zile (Bhot și Piotigorsky, 1979).

*DNA recombinant conținînd gena corticotropinei și a  $\beta$ -lipotropinei.* S-a pornit de la mRNA care codifică polipeptida precursorare corticotropinei (ACTH) și  $\beta$ -lipotropinei (LPH) pentru a obține cDNA corespunzător genei. Aceasta a fost apoi inserată într-o plasmidă și clonată în bacterii (Roberts și colab., 1979).

## IX.8. Obținerea DNA recombinant prin experiment de tip shotgun

Acest tip de experiment este considerat mult mai periculos decât cele efectuate conform tehnicilor arătate cu materiale bine purificate și caracterizate, deoarece în acest caz DNA recombinant de interes

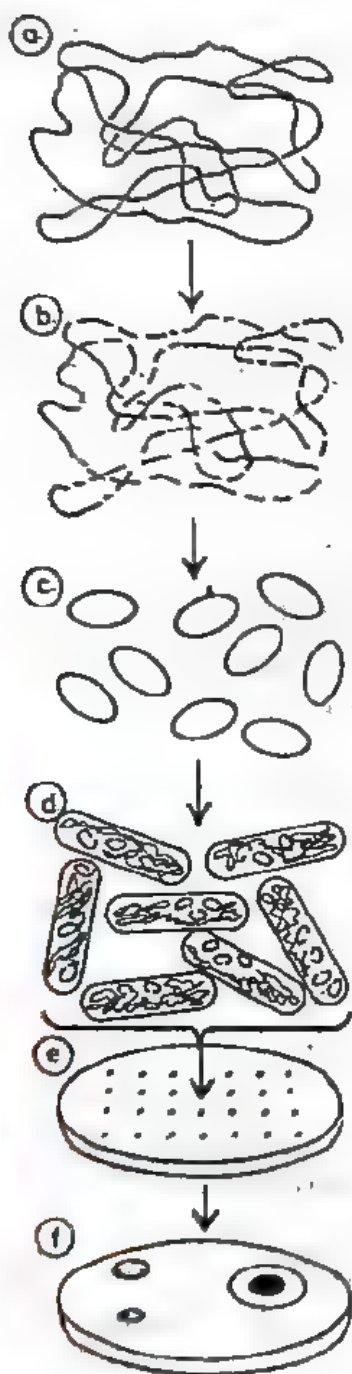


Fig. 90. Schema unui experiment de tip „shotgun”  
(după Grobstein, 1977).

se obține la întâmplare, iar alături de el mai apare un evantai întreg de alți DNA recombinanți, dintre care unii pot genera organisme noi, patogene.

Dar să redăm principiul pe care se bazează experimentul. Se extrage DNA cromozomal dintr-un organism al cărui DNA conține gena de interes pe care dorim să o multiplicăm și să o exprimăm cu ajutorul unui vehicul adecvat. DNA este supus acțiunii uneia sau mai multor enzime de restricție care îl fragmentează. Paralel se pregătește un vehicul adecvat, înțelegând prin aceasta izolarea și tratarea lui cu una sau mai multe enzime de restricție pentru a-i crea capete coezive. De precizat că atât DNA cromozomal, cât și vehiculul se fragmentează cu aceleași enzime de restricție, pentru a rezulta capete coezive identice.

În continuare, se amestecă cele două componente (fragmentele de DNA cromozomal și vehiculul pregătit), ceea ce permite cuplarea la întâmplare a vehiculelor cu diferite fragmente de DNA. În acest moment se produc o serie întreagă de DNA recombinanți diferiți, amestecul lor fiind folosit apoi la transformarea celulară. Celulele-gazdă sînt cultivate pe un mediu adecvat, iar fiecare celulă receptoare de DNA recombinant se dezvoltă sub forma unei colonii. Dată fiind heterogenitatea materialului folosit pentru transformarea celulară, el generează diverse colonii, corespunzătoare diferiților DNA recombinanți incluși. Se formează o adevărată „bibliotecă de gene”, cum o numește Grobstein (1977), constituită din celule care conțin DNA recombinanți formați din același tip de vehicul, dar cu fragmente diferite de DNA cromozomal.

Clonele obținute sînt apoi analizate pentru a le identifica pe acelea care conțin DNA recombinanți de interes. Metoda cea mai convenabilă este cea bazată pe hibridizarea specifică a celulelor direct pe membrane de nitroceluloză.

Un experiment de tip *shotgun* este prezentat schematic în fig. 90.

## Bibliografie

1. Berg, K. Heron, I. *Scand. J. Immunol.*, **11**, 489 (1980).
2. Bhat, S.P., Piatigorsky, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 3299 (1979).
3. Blacke, C.C.F., *Nature*, **273**, 267 (1978).
4. Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crossa, J.H., Falkow, S., *Gene*, **2**, 95 (1977).
5. Black, C., Tonegawa, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **74**, 5652 (1977).
6. Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., Chambon, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 2458 (1978).
7. Breathnach, R., Mandel, J.L., Chambon, P., *Nature*, **270**, 314 (1977).
8. Burrell, C.J., Mackay, P., Greenway, P.J., Hoffschneider, P.H., Murray, K., *Nature*, **279**, 43 (1979).
9. Cantell, K., Hirvonen, S., Morgensen, K.E., Pyhala, L., in „*In vitro Monography*”, **3**, 35 (1973).
10. Cantell, K., Strander, H., *Symp. Univ. Uppsalla*, p. 73 (1977).
11. Chambon, P., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**, 1211 (1978).
12. Chan, S.J., Keim, P., Steiner, D.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 1964 (1976).
13. Charnay, P., Pourcel, C., Fritsch, A., Louise, A., Collais, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 2222 (1979).



14. Clarke, I., Carbon, J., *J. Mol. Biol.* **120**, 517 (1968).
15. Crea, R., Kraszewsky, A., Hirose, T., Itakura, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 5765 (1978).
16. Curtiss, R. III, *Miami Winter Symp.*, **13**, 44 (1977).
17. Davies, B.D., Tai, P.C., *Nature*, **283**, 433 (1980).
18. Dianzani, F., Baron, S., *Tex. Rep. Biol. Med.*, **35**, 297 (1977).
19. Dickson, R.C., Abelson, J., Barnes, W.M., Reznikoff, W.S., *Science*, **187**, 27 (1975).
20. Doell, M.T., Houghton, M., Cook, E.A., Carey, N.H., *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3701 (1977).
21. Dugalczyk, A., Wood, S.L.C., Colbert, D.A., Lai, E.C., Mace, M.L., O'Malley, B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 2253 (1979).
22. Efstratiadis, A., Kafatos, F.C., Maniatis, T., *Cell*, **10**, 571 (1977).
23. Emtage, J.S., Tacon, W.C.A., Catlin, G.H., Jenkins, B., Porter, A.C., Carey, N.H., *Nature*, **283**, 10 (1980).
24. Fanconier, B., Ruffault, A., *comunicare Acad. Sci. Paris*, 5 februarie (1980).
25. Fothergill, L.A., Fothergill, J.E., *Biochem. J.*, **116**, 555 (1970).
26. Fraser, T.H., Bruce, B.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 5936 (1978).
27. Friedman, R.M., *Pharmacol. Ther.*, **2**, 5425 (1978).
28. Fritsch, A., Pourcel, C., Charnay, P., Tiollais, P., *C.R. Acad. Sci. Paris*, **287**, 1453 (1978).
29. Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P., *Nature*, **281**, 646 (1979).
30. Garapin, A.C., Cami, B., Roskam, W., Kourilsky, P., LePennec, J.P., Perrin, F., Gerlinger, P., Cocher, M., Chambon P., *Cell*, **14**, 629 (1978a).
31. Garapin, A.C., LePennec, J.P., Roskam, W., Perrin, F., Cami, B., Krust, A., Breathnach, R., Chambon, P., Kourilsky, P., *Nature*, **273**, (1978b).
32. Gilbert, W., *Nature*, **271**, 501 (1978).
33. Gilbert, W., Gralla, J., Majors, J., Maxam, A., in *"Protein-ligand interactions"*, ed. H. Sund & G. Blauer (Berlin), p. 193 (1975).
34. Goedell, O.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.J., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewsky, A., Itakura, K., Riggs, A.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 106 (1979).
35. Goldstein, L.D., Georgiadis, J.A., Longford, M.P., *IRCS Med. Sci.*, **7**, 560 (1979).
36. Havell, E.A., Vilcek, J., in *"In vitro Monography"*, **3**, 47 (1974).
37. Havell, E.A., Yip, Y.K., Vilcek, J., *J. Gen. Virol.* **38**, 51 (1978).
38. Hirsch, S.M., Swartz, M.N., *New Engl. J. Med.*, **302**, 947 (1980).
39. Hooijmakers, J.H.J., Borst, P., van der Burg, J., Wriessmann, C., Cross, G.A.M., *Gene*, **8**, 391 (1980).
40. Humphries, P., Cochet, M., Krust, A., Gerlinger, P., Kourilsky, P., Chambon, P., *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2389 (1977).
41. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
42. Johnson, H.M., Baron, S., *Cell Immunol.*, **25**, 106 (1976).
43. Kerr, I.M., Brown, R.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 256 (1978).
44. Klessig, D., *Cell*, **12**, 9 (1977).
45. Knight, jr. E., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4139 (1975).
46. Knight, jr. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 520 (1976).
47. Knight, jr. E., Hunkapiller, M.W., Khorana, G.H., Hardy, R., W.F., Hood, L.E., *Science*, **207**, 525 (1980).
48. Kronenberg, H.M., McDevitt, R.F., Majzouh, J.A., Nathans, J., Sharp, P.A., Potts, J.P., Rich, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 4981 (1979).
49. Lai, E.C., Woo, S.L., Dugalczyk, A., Catterall, J.F., O'Malley, B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 2205 (1978).
50. Laver, W.G., *Virology*, **45**, 273 (1971).

51. Mandel, J.L., Breathnach, R., Gerlinger, P., LeMeur, M., Gannon, F., Chambon, P., *Cell*, **14**, 641 (1978).
52. Mantei, M., s.a., *Gene*, **10**, 1 (1980).
53. McKnight, G.S., *Cell*, **14**, 403 (1978).
54. McReynolds, L.A., Catterall, J.F., O'Malley, B.W., *Gene*, **2**, 217 (1977).
55. McReynolds, I.A., O'Malley, B.W., Nisbet, A.D., Fothergill, J.E., Givol, D., Fields, S., Robertson, M., Brownlee, G.G., *Nature*, **273**, 723 (1978).
56. Mercereau-Pujalon, O., Royal, A., Cami, B., Garapin, A., Krust, A., Gannon, F., Kourilsky, P., *Nature*, **275**, 505 (1978).
57. Miller, J.H., in „*Experiments in molecular genetics*“, Cold Spring Harb. Lab., Cold Spring Harbor (New York), p. 395 (1972).
58. Nagata, S., Tairo, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli, M., Ball, W., Cantell, K., Weissmann, C., *Nature*, **284**, 316 (1980).
59. Ohori, H., Omadera, S., Ishida, N., *J. Gen. Virol.*, **43**, 423 (1979).
60. Okamura et al., *Biochemistry*, **19**, 3831 (1980).
61. Oxman, M., *Tex. Rep. Biol. Med.*, **35**, 230 (1977).
62. Palese, P., *Cell*, **10**, 1, (1977).
63. Palese, P., Shulman, J.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 2142 (1976).
64. Palmiter, R.D., *Cell*, **4**, 189 (1975).
65. Palmiter, R.D., Gagnon, J., Walsh, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 94 (1978).
66. Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., MacKay, P., Leadbetter, G., Murray, K., *Nature*, **282**, 575 (1979).
67. Pons, M.W., *Virology*, **69**, 789 (1976).
68. Porter, A.G., Barber, C., Carey, N.H., Hallowell, K.A., Theelfall, G., Emtage, J.S., *Nature*, **282**, 471 (1979).
69. Rembach, A., Hogness, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **74**, 5041 (1977).
70. Redecker, A., *Am. J. Med. Sci.*, **270**, 9 (1975).
71. Riggs, A.D., Itakura, K., *Am. J. Hum. Genet.*, **31**, 531 (1979).
72. Ritchey, M.B., Palese, P., Shulman, J.L., *J. Virol.*, **20**, 307 (1976).
73. Roberts, J.L., Seeburg, P.H., Shine, J., Herbert, E., Baxter, J.D., Goodman, H.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 2153 (1979).
74. Robinson, W.S., *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 357 (1977).
75. Robinson, W.S., Sattler, F., Siddiqui, A., „*Max Pettenkofer Intern. Symp. on Viral Hepatitis*“, München 5—7 aprilie (1979).
76. Rubinstein, M., Rubinstein, S., Familletti, P.C., Miller, R. S., Walman, A.A., Pestka, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 640 (1979).
77. Sambrook, J., *Nature*, **286**, 101 (1977).
78. Samuel, C.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 610 (1979).
79. Sanger, F., Air, G.M., Burrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchinson, C.A. III, Slocumbe, P.M., Smith, M., *Nature*, **265**, 687 (1977).
80. Schmidt, A., Chernajowksy, Y., Shulman, L., Federman, P., Berissi, H., Revel, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 4788 (1979).
81. Shope, R.E., *J. Exp. Med.*, **54**, 373 (1931).
82. Smith, W., Andrewes, C.H., Laidlow, P.P., *Lancet*, **2**, 66 (1933).
83. Steiner, D.F., Cunningham, D., Spiegelman, S., *Science*, **157**, 697 (1967).
84. Stewart, II W.E., s.a., *Nature*, **286**, 110 (1980).
85. Streuli, M., Nagata, W., Weissmann, C., *Science*, **209**, 1343 (1980).
86. Struhl, K., Cameron, R.J., Davies, R.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 1471 (1977).
87. Szmuness, W., *Annu. J. Path.*, **81**, 629 (1975).
88. Tacon, W.A., Carey, N.H., Emtage, J.S., *Mol. Gen. Genet.*, citat de Emtage și colab. (1980).
89. Taniguchi, T., Ohno, S., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, Y., *Gene*, **10**, 11 (1980).
90. Taira, H., s.a., *Science*, **207**, 528 (1980).
91. Törma, E.T., Poucker, K., *J. Biol. Chem.*, **251**, 4810 (1976).

92. Tilghman, S.M., Curtis, P.J., Tiemeier, D.C., Leder, P., Weissmann, C., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.*, **75**, 1309 (1978).
93. Ullrich, P., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischler, E., Rutter, W.J., Goodman, H.W., *Science*, **196**, 1313 (1977).
94. Ward, C.W., Dopheide, T.A., *Brit. Med. Bull.*, **35**, 51 (1979).
95. Waterfield, M.D., Espelie, K., Elder, K., Skehel, J.J., *Brit. Med. Bull.*, **35**, 57 (1979).
96. Weinstock, R., Sweet, R., Weiss, M., Cedar, H., Axel, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 1299 (1978).
97. Wiley, D.C., Skehel, J.J., Waterfield, M.D., *Virology*, **79**, 446 (1977).
98. Zoon, K.C., Smith, M.E., Briolgen, P.J., Anfinsen, C.B., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., *Science*, **207**, 528 (1980).



## X. Perspective

Realizările menționate în capitolul anterior nu sînt singurele, dar spațiul pe care îl avem la dispoziție nu permite inventarierea tuturor. Considerăm însă că cele prezentate demonstrează în mod convingător că în momentul de față nu există nici un obstacol major în calea realizării de către bacterii a unor produse caracteristice organismelor superioare. Prin urmare, este poate util să conturăm unele perspective pe care le are tehnologia DNA recombinant în diferite domenii, și, în principal, perspectivele introducerii de gene procariote la organismele superioare.

### X.1. Perspective în medicină și în industria farmaceutică

Principalele perspective care se conturează la orizont în acest domeniu sînt următoarele:

- producția de hormoni;
- producția de antigene;
- producția de anticorpi;
- producția de enzime;
- producția de reactivi necesari diagnosticului;
- posibilitatea de a preveni și vindeca unele maladii ereditare, precum și cancerul.

Întrucît producția unor hormoni, antigene, anticorpi și enzime prin tehnologia DNA recombinant s-a și realizat, problema principală care se pune pentru viitor este utilizarea noii tehnologii la obținerea altor produși de acest fel care, în momentul de față, sînt fabricați prin procedee clasice, la un preț de cost ridicat, motiv pentru care utilizarea

lor în terapie este limitată. Dată fiind această situație, în continuare se vor analiza doar unele perspective legate de:

- obținerea de produse noi necesare diagnosticului medical;
- prevenirea și tratarea maladiilor ereditare, vindecarea cancerului.

### X.1.1. Diagnosticul prenatal

Într-o lucrare recentă (1978) Kan și Dozy au arătat în mod clar că există posibilitatea de a introduce metodele tehnologiei DNA recombinant și în diagnosticul prenatal. În acest scop autorii recomandă utilizarea analizei de restricție și hibridizare a DNA fetal. Metoda are toate șansele ca în viitor să fie generalizată pentru diagnosticul prenatal al maladiilor genetice grave.

### X.1.2. Prevenirea și vindecarea unor maladii ereditare

Există o serie întreagă de maladii ereditare cauzate de dereglări apărute în metabolismul unor aminoacizi din organismul uman sau animal. Astfel de maladii sînt fenilcetonuria, tirozinoza, albinismul și alcaptonuria.

Fenilcetonuria se manifestă metabolic prin imposibilitatea organismului uman de a oxida acidul fenilpiruvic la acid *p*-hidroxifenilpiruvic corespunzător. În consecință, acidul fenilpiruvic se acumulează și este excretat în urină. Indivizii care excretă această substanță în locul produșilor ei de degradare sînt în mod invariabil deficienți mintali, fiind clasificați ca idioți.

Tirozinoza este caracterizată de imposibilitatea organismului de a converti acidul *p*-hidroxifenilpiruvic în acid 2,5-dihidroxifenilacetic care, în mod normal, se degradează în CO<sub>2</sub> și apă. În consecință, bolnavii de tirozinoză au cantități mari de acid *p*-hidroxifenilpiruvic în urină.

Organismul uman (sau animal) normal are capacitatea de a oxida tirozina pînă la 3,4-dihidroxifenilalanină (cunoscută sub denumirea de DOPA). DOPA este un precursor al pigmentului melanină care dă culoare părului, pielii și ochilor. Există însă indivizi care se nasc cu păr alb, piele care nu se bronzează și iris roz. Cercetările au arătat că în organismul lor nu se produce conversia a 3,4-dihidroxifenilalaninei în melanină, motiv pentru care respectivii devin albinoizi.

Alcaptonuria este una dintre cele mai vechi maladii ereditare cunoscute. Ea rezultă în urma unei reacții de blocare care intervine în catabolismul fenilalaninei și al tirozinei. În mod normal, în organismul uman fenilalanina și tirozina sînt oxidate la acid fenilpiruvic și, respectiv

acid *p*-hidroxifenilpiruvic. Printr-o serie de reacții succesive, acidul *p*-hidroxifenilpiruvic este transformat în acid 2,5-hidroxifenilacetic (acid homogentisic cunoscut și sub denumirea de alcapton). Acidul 2,5-hidroxifenilacetic (alcaptonul) este în final degradat în  $\text{CO}_2$  și apă. Indivizii care nu pot degrada alcaptonul, îl acumulează întâi în sângele lor și apoi îl elimină în urină. Prezența alcaptonului în urină este ușor de recunoscut, deoarece în acest caz urina devine neagră după expunerea ei la aer.

Studiul biochimic al serului bolnavilor de alcaptonurie a arătat că indivizii afectați nu au enzima care catalizează reacția de oxidare a alcaptonului. Este vorba de homogentizatoxidaza. De aici a rezultat că, la fel ca și în celelalte maladii menționate, boala este provocată de lipsa unei enzime necesare degradării produșilor intermediari ai fenilalaninei și tirozinei. Mergînd mai departe, s-a ajuns la concluzia că anomaliiile metabolismului fenilalaninei și tirozinei sînt provocate de genele represive care în stare homozigotă determină blocarea catabolismului

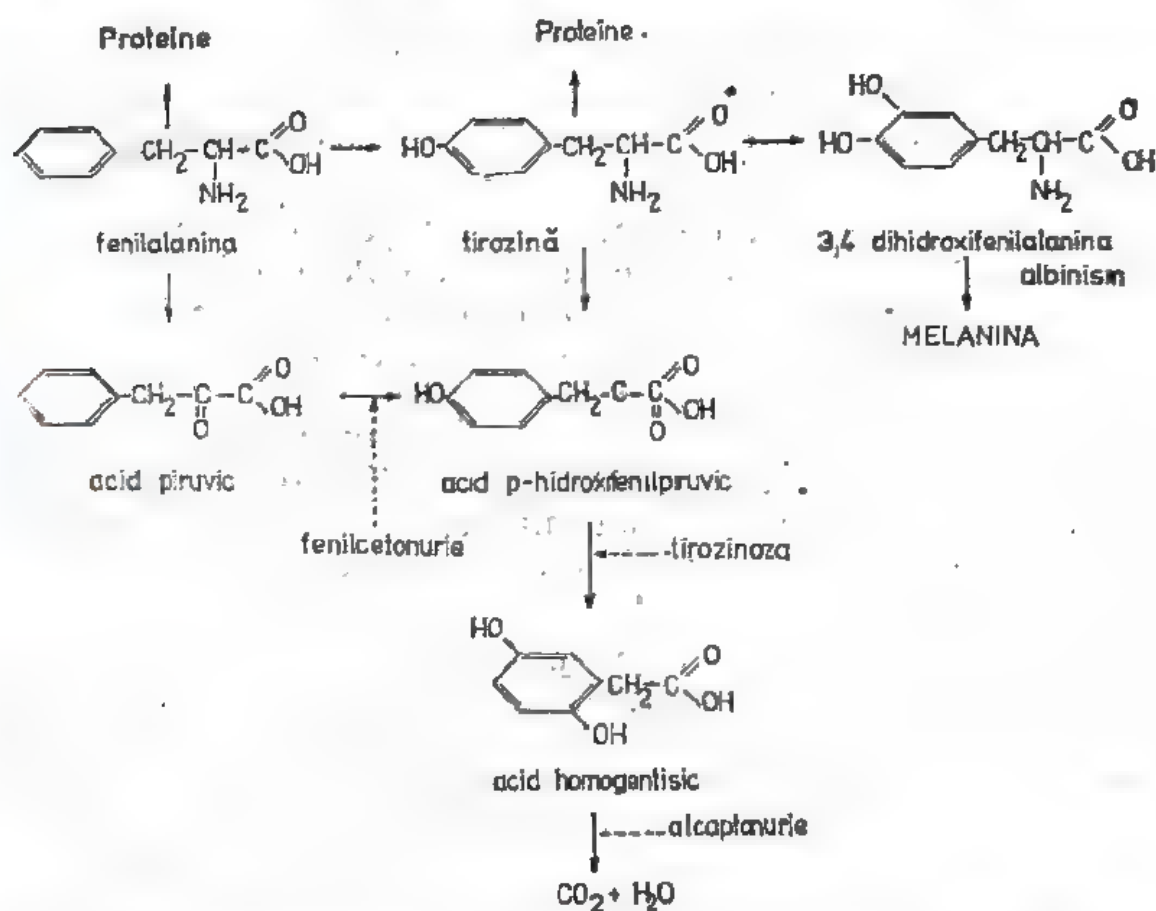


Fig. 91. Principalele reacții ale catabolismului fenilalaninei și tirozinei. Săgețile întrerupte indică locul unde se produce dereglarea catabolismului, cu apariția unor boli metabolice ereditare.

acestor aminoacizi. Schema reacțiilor metabolismului aminoacizilor menționați este redată în fig. 91.

Perspectiva pe care o oferă tehnologia DNA recombinant în vindecarea maladiilor metabolice ereditare sau de altă natură, cum ar fi de exem-



plu anemia falciformă, constă în introducerea prin intermediul unui vehicul adecvat la indivizii afectați, a genelor necesare sintezei componentelor care lipsesc. Această perspectivă se va realiza în curând, pentru că ceea ce Luria a prezis acum cinci ani, și anume că „se va putea introduce o genă normală în corpul unui individ viu prin injectarea unei soluții de DNA conținând gena normală”, s-a și realizat pe animale de experiență. Este interesant de menționat că Luria, cu geniul său de vizionar, a descris principiile de bază ale „tratamentului cu gene” efectuat pentru prima oară în 1980. „Ceea ce este posibil să se facă — spunea Luria — este să se recolteze celule de la un pacient, celulele să fie cultivate în laborator, în ele să se introducă genele dorite, și apoi să fie restituite corpului pacientului”. Or, metodologia utilizată de Cline și colab. (1980), care va fi descrisă mai departe, pentru introducerea unei gene noi în genomul unor șoareci, este aproape identică. Dacă la începutul anului 1980 s-a exprimat doar speranța că în următorii ani experiențele de acest fel se vor face pe pacienți suferinzi de diferite maladii ereditare; la sfârșitul anului, agențiile de presă au anunțat că echipa doctorului Cline a reușit chiar să vindece prin procedeul lor două tinere bolnave de talasemie.

O perspectivă deosebit de importantă în tratamentul maladiilor ereditare o deschide lucrarea elaborată de Ruddle, Gordon și Scaugos (1980) \*. Acești autori, perfecționând procedeul lui Cline și colab., au realizat grefa unei gene chiar la un embrion de șoarece. Este vorba de transferul genei timidinkinazei la un embrion de șoarece. Cu toate că lucrarea nu a avut ca scop final vindecarea unei maladii ereditare ci numai acela de a stabili dacă o genă grefată la un embrion se poate regăsi în toate celulele organismului său matur, ea va sta fără îndoială la baza acelor care se vor efectua pentru corectarea defectelor genetice.

Etapele transferului de gene la embrionul de șoarece au fost următoarele: 1) s-a izolat gena timidinkinazei (TK) din genomul virusului herpetic; 2) s-a izolat fragmentul de DNA care conține originea replicării DNA al virusului SV40; 3) gena TK și fragmentul de DNA SV40 au fost introduse prin tehnologia DNA recombinant într-o plasmidă obținându-se o plasmidă modificată; 4) embrionul de șoarece s-a tratat cu plasmida modificată și s-a reimplantat la șoarecele mamă; 5) s-a determinat activitatea timidinkinazică a șoarecilor proveniți din embrionii tratați.

Din 78 de embrioni astfel tratați numai unul a prezentat activitate timidinkinazică a celulelor sale. Randamentul de transfer de genă TK a fost deci foarte mic. Se speră însă ca prin modificarea procedurii eficiența integrării și exprimării genei să fie mult îmbunătățită. De asemenea, mai rămîne să se stabilească, ceea ce este extrem de important,

\* Lucrare comunicată la al 2-lea Congres Internațional de biologie celulară, Berlin, sept. 1980.

și, anume, dacă gena grefată se transmite sau nu descendenților. De fapt, acest rezultat va arăta dacă gena a fost corect introdusă în genomul șoarecelui.

### X.1.3. Tratamentul cancerului

Cline și colab. (1980) au pus la punct un procedeu nou prin care celulele măduvei osoase (producătoare de elemente sanguine) ale șoarecilor, devin rezistente la un medicament anticanceros foarte eficace dar și foarte toxic cunoscut sub denumirea de metotrexat. Acest procedeu poate deveni în curând un complement de prim ordin pentru tratamentele clasice ale cancerului.

Procedeul lui Cline nu se bazează pe tehnologia DNA recombinant. Însă, datorită faptului că implicațiile sale în medicina umană vor fi imense, vom descrie succint caracteristicile sale principale. Mai există și următorul motiv: după cum se va vedea, procedeul lui Cline este susceptibil de a fi îmbunătățit, iar tehnologia DNA recombinant va fi aceea care va contribui în mod substanțial la generalizarea și creșterea eficienței sale.

Înainte de a descrie însă procedeul, este util să precizăm unele date referitoare la mecanismul de acțiune a unor substanțe anticancerose. Se știe că medicamentele anticancerose au o eficacitate limitată datorită faptului că ele distrug nu numai celulele maligne ci și cele sănătoase. Pentru a proteja selectiv celulele sănătoase față de acțiunea medicamentului, acestea trebuie dotate cu o genă nouă care să le confere rezistența specifică necesară. Cu alte cuvinte, gena nouă trebuie să determine ca celulele sănătoase să devină rezistente, în timp ce, celulele cancerose care nu primesc gena, să rămână sensibile la medicamentul anticanceros.

În acest fel s-a descris ideea principală a procedurii lui Cline. Etapele sale sînt următoarele: din celulele rezistente la acțiunea metotrexatului (selecționate în mod special) se extrage DNA. După cum se va arăta mai departe, o fracțiune din DNA extras din celulele rezistente la metotrexat reprezintă gena responsabilă de sinteza enzimei dihidrofolatreductază (DHFR) \*. Paralel se extrage măduva osoasă de la șoarece și se pune în contact cu DNA extras din celulele rezistente la metotrexat în prezență de ioni de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sub influența ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$ , (care măresc permeabilitatea membranei) DNA pătrunde în celulele măduvei osoase și printr-un mecanism încă insuficient cunoscut se combină

\* De precizat că metotrexatul acționează asupra celulelor prin inhibarea acțiunii DHFR, enzimă indispensabilă celulei; DHFR determină transformarea acidului dihidrofolic în acid tetrahidrofolic, iar acesta din urmă este implicat direct în sinteza proteinelor celulare indispensabile vieții celulelor. Prin urmare, celulele rezistente la acțiunea metotrexatului au gena pentru DHFR amplificată de mai multe ori.



cu DNA propriu. În urma acestei interacții (recombinări) se produce transferul genei responsabile de sinteza DHFR de la celulele rezistente la acțiunea metotrexatului la celulele măduvei osoase. Transferul genei a fost dovedit astfel: în cavitatea peritoneală a șoarecilor s-au inoculat celulele de măduvă osoasă tratate cu DNA conținând gena de rezistență la metotrexat (producătoare de DHFR). În mod curios aceste celule au ajuns exact în măduva osoasă unde s-au multiplicat, iar după câteva zile de la injectarea lor au sintetizat chiar globule albe și roșii. Proba finală a constatat în tratamentul acestor șoareci cu doze din ce în ce mai mari de metotrexat. S-a observat că animalele astfel tratate sînt rezistente la metotrexat, ceea ce a dovedit că transferul de genă a fost realizat. Prin urmare, în procedeul lui Cline gena a fost transferată prin intermediul unui DNA întreg. Fără îndoială că procedeul se va îmbunătăți în momentul în care se va lucra numai cu gene de interes.

Intrucît gena responsabilă de sinteza DHFR a fost localizată într-un cromozom este posibil ca în viitorul apropiat ea să fie separată, clonată și amplificată prin tehnologia DNA recombinant. Ca atare, atît această genă cît și altele vor putea fi introduse mult mai eficient în celulele ale căror proprietăți trebuie modificate.

De asemenea, sînt mari speranțe în folosirea tehnologiei DNA recombinant în prevenirea și tratamentul cancerului, generate de cercetările care au realizat cartarea genoamelor unor virusuri oncogene. În momentul de față, pentru unele din aceste virusuri s-au și precizat atît zonele moleculare ale acidului nucleic responsabile de transformarea celulelor normale în celule canceroase, cît și componentele proteice care intervin în cursul acestui proces. Or, identificarea la nivel molecular a unor componente care condiționează transformarea celulară oferă posibilitatea înțelegerii mecanismului de transformare și, totodată, deschide perspectiva găsirii căilor celor mai eficiente de a preveni sau trata cancerul.

## X.2. Perspective în domeniul agro-alimentar

Asigurarea resurselor de hrană pentru întreaga populație — astăzi ajunsă la o cifră de 4,5 miliarde de oameni — este una din cele mai stringente probleme căreia trebuie să-i găsească răspuns umanitatea. Complexitatea acestei probleme, generată în mare măsură și de faptul că întinse zone ale planetei sînt atinse de flagelul subdezvoltării, face însă ca răspunsul să întîrzie.

Este evident că găsirea unor soluții viabile pentru problema alimentației se află într-o relație strînsă și nemijlocită cu creșterea într-un ritm susținut a producției agricole mondiale, în special a producției cerealiere. Care este însă situația pe plan mondial? Între anii 1971—75,



ritmul mediu anual de creștere a producției agricole mondiale a fost de 1,2%, apropiat de cel al creșterii demografice, menținând problema alimentației, practic, în aceleași limite — ritmul de creștere ar fi trebuit să fie cel puțin dublu pentru a se putea începe un proces real de înlăturare a fenomenelor negative, generate de foamete. În anii următori, 1976—1978, în zonele cele mai afectate de flagelul lipsei cronice de alimente s-a înregistrat chiar un regres al producției agricole.

Așa stând lucrurile, în aceste condiții se poate pune întrebarea dacă problema alimentației este sau nu rezolvabilă? Este evident că ea poate fi soluționată. Ar fi suficient să amintim în acest sens că dacă în Europa suprafețele cultivabile sînt folosite aproape integral, în America de Sud și Africa abia ating 33% și, respectiv 21%.

Deci o cale ar fi cultivarea unor terenuri suplimentare. Aceasta ar atrage — bineînțeles — fertilizarea noilor suprafețe, în vederea creșterii recoltelor. Dar aici se ridică o nouă problemă: consumul de energie necesar producerii de îngrășăminte azotoase este imens; după unii autori anual se folosesc în acest scop peste 20 milioane barili de petrol. Însă lucrurile nu se limitează aici. Transportul și plasarea adecvată a îngrășămintelor azotate implică și alte cheltuieli suplimentare.

O altă cale de realizare de recolte mai bogate este oferită de tehnologia DNA recombinant, prin transferul genelor fixatoare de azot, la plantele de interes major din punct de vedere al alimentației. Se știe că fixarea azotului din atmosferă se produce în sol, de către unele bacterii cum ar fi *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae*, precum și în unele plante care au simbioți procariotici fixatori de azot. Dintre aceste plante însă nu fac parte nici cerealele care asigură recoltele majore (grîul, porumbul, orezul), nici iarba — furnizorul major de furaj, ci leguminoasele (trifoi, lucernă, fasole, mazăre, lupin) care trăiesc în simbioză cu bacterii de tip *Rhizobium*, motiv pentru care cultivarea lor nu mai necesită îngrășăminte pe bază de azot.

Bacteriile menționate reușesc să fixeze azotul atmosferic — proces fundamental în ciclul azotului în natură, care condiționează însăși viața organismelor, — grație faptului că ele sînt dotate cu un sistem enzimatic specific, denumit sistem nitrogenazic. Aceste bacterii au în genomul lor gene *nif*, care codifică proteinele din sistemul enzimatic complex al nitrogenazelor, responsabil de transformarea azotului molecular atmosferic în compuși organici. Fixarea biologică a azotului atmosferic se face prin reacții enzimactice, la energie joasă, avînd și avantajul autoreglării în funcție de necesitățile organismului fixator de azot. Eliminarea îngrășămintelor cu azot din practica agricolă ar permite deci și reducerea investițiilor din industria chimică, concomitent cu îndepărtarea efectelor negative ale îngrășămintelor, ceea ce va duce la eutrofizarea râurilor și lacurilor, la depoluarea unor surse de apă potabilă etc.

Se speră ca, alături de obținerea prin tehnologia DNA recombinant a unor proteine de tipul ovalbuminei, care ar putea contribui la rezolvarea „foamei de proteine”, să se reușească prin aceeași tehnologie și obținerea în laborator a noi tipuri de plante — cereale și plante furajere — capabile să-și fixeze singure azotul atmosferic de care au nevoie, ceea ce va asigura și necesarul de hrană bine echilibrată în aminoacizi pentru om și animale în țările slab dezvoltate.

### X.2.1. Fixarea biologică a azotului atmosferic

Pentru ca procesul biologic de fixare a azotului atmosferic să devină în viitor un factor productiv, numeroși cercetători și-au consacrat activitatea cunoașterii mecanismelor moleculare și biochimice care intervin în acest proces.

În anii '60 s-a stabilit că fixarea biologică a azotului atmosferic este condiționată de un sistem enzimatic complex, denumit *nitrogenază*, al cărei rol constă în reducerea azotului ( $N \equiv N$ ) la amoniac  $NH_3$  (amoniu  $NH_4^+$ ). Lucrându-se în absența aerului, în condițiile conservării activității enzimaticе (aerul determină dispariția activității respective), s-au putut izola sisteme enzimaticе nitrogenazice din diverse microorganisme. S-a constatat că nitrogenaze provenind din surse diferite prezintă o mare asemănare din punct de vedere chimic și structural. Sistemul enzimatic al nitrogenazelor este format din două componente proteice diferite:

a) o proteină mare, cu structură tetramerică (masă moleculară 250000 D), care conține doi atomi de molibden și 32 atomi de fier (legați de atomi de sulf printr-o legătură labilă în mediu acid) — denumită *molibdoferredoxina* sau, pe scurt, *proteina Mo-Fe*;

b) o proteină cu dimensiuni mai reduse, avînd structură de dimer (masa moleculară 60000 D), care conține 4 atomi de fier (legați labil de atomi de sulf) — denumită *azoferredoxină* sau, pe scurt, *proteina Fe*.

Nitrogenaza este activă numai atunci cînd conține ambele specii de proteine, pentru că nici una dintre cele două componente nu este enzimatic activă ca atare. Adeseori se pot reconstitui nitrogenaze hibride, prin amestecarea unei unități de proteină Mo—Fe de la o specie, cu proteină Fe de la o altă specie de microorganism fixator de azot. De exemplu, proteina Mo—Fe din *Klebsiella pneumoniae* formează o enzimă deosebit de activă împreună cu proteina Fe de la *Azotobacter chroococcum* sau *Bacillus polymyxa*. În alte cazuri, hibridul rezultat este parțial sau chiar deloc activ.

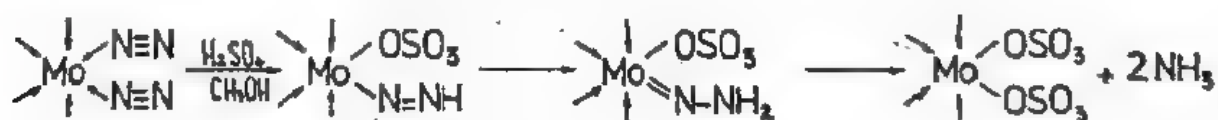
Similitudinea biochimică a nitrogenazelor merge și mai departe. Astfel toate sistemele de fixare a azotului cunoscute pînă în prezent au nevoie de agenți reducători naturali asemănători, reprezentați de mici proteine cu caracter reducător, conferit de gruparea lor proste-



tică: *flavodoxinele* și *ferredoxinele*. În plus, funcționarea tuturor sistemelor nitrogenazice necesită prezența ATP, ca furnizor de energie, și  $Mg^{2+}$ . S-a constatat că aceste enzime complexe pot reduce nu numai legătura triplă din molecula de azot ( $N \equiv N$ ), ci își pot exercita acțiunea și asupra altor substraturi a căror moleculă comportă o triplă legătură (acetilenă  $HC \equiv CH$ , acid cianhidric  $H-C \equiv N$ , azidă  $H-N-\bar{N}=\bar{N}^+$ , oxid nitros  $N \equiv N=O$ , pe care le transformă în etilenă  $H_2C=CH_2$  și, respectiv metan + amoniac, azot și amoniac, azot și apă). Dealtfel, pe transformarea acetilenă  $\rightarrow$  etilenă se bazează și metoda gaz-cromatografică foarte sensibilă, utilizată astăzi curent, pentru dozarea activității nitrogenazice.

O altă caracteristică comună pentru nitrogenazele de diverse proveniențe este sensibilitatea lor la oxigen; cea mai ușor alterabilă este proteina Fe. Acest fapt a impus punerea la punct a unor metode de purificare a enzimelor în absența aerului și la ora actuală s-a reușit chiar cristalizarea unora dintre aceste proteine!

**X. 2.1.1. Mecanismul de reducere a azotului atmosferic la amoniac.** Mecanismul nu este pe deplin elucidat încă. Se presupune că proteina Mo—Fe „ancorează” substratul, adică azotul molecular, pe molibden. Pe de altă parte, proteina Fe, împreună cu ATP în prezența ionilor  $Mg^{2+}$ , ar avea sarcina de a furniza energia necesară inducerii unei stări super-reduce a proteinei Mo—Fe, care constituie partea activă a enzimei. Legarea azotului la atomul de metal tranzițional are loc cu probabila formare a unor complecși diazotați, din care azotul se elimină ca amoniac:



Reacția de formare a unei molecule de amoniac consumă aproximativ 15 molecule ATP. S-ar putea ca numeroșii atomi de fier ai proteinei Mo—Fe să aibă rolul de a „înmagazina” electronii necesari în această reacție de reducere.

Trebuie însă spus că între reacția de fixare biologică a azotului și modul aerob de viață al microorganismului (care furnizează ATP și reducătorii necesari prin procesul de fotosinteză) există o incompatibilitate esențială pe care acesta trebuie să o rezolve. În cursul evoluției, microorganismele respective au adoptat unele stratageme fiziologice care au dus la excluderea — totală sau parțială — a accesului oxigenului la centrul fixator de azot. În acest sens acționează:

— reglarea respirației, în scopul menținerii unei tensiuni mici de oxigen;



— compartimentarea subcelulară, astfel încât enzima atașată la membranele celulare nu este sensibilă la oxigen, spre deosebire de enzima liberă care nu rezistă;

— compartimentarea celulară (la unele bacterii albastre-verzi fixatoare de azot există celule mari, specializate, din care lipsesc compușii fotosintetici, necesari degajării oxigenului);

— existența unor sisteme tampon pentru oxigen (în nodulii de prădăcinile plantelor leguminoase există o concentrație ridicată de leghemoglobină, pigment cu o mare afinitate pentru oxigen și cu rol de transportor specializat, ferind nitrogenaza de o presiune prea mare de oxigen).

**X. 2.1.2. Genele care controlează sistemul nitrogenazic (genele *nif*).** Sinteza sistemului enzimatic al nitrogenazei este sub controlul unui grup de gene, denumite gene *nif* (de la „nitrogen fixation”), care au fost intens studiate, în special la bacteria fixatoare de azot *Klebsiella pneumoniae*. Analiza transducțională cu bacteriofagii *P1*, *P2* etc. a permis localizarea regiunii genelor *nif* în cromozomul acestei bacterii, stabilindu-se vecinătatea lor cu operonul pentru biosinteza histidinei.

Conform celor mai recente date de analiză genetică, regiunea genelor *nif* cuprinde aproximativ 15 cistroni, grupați în 6 unități de transcriere cu rol cunoscut; s-a sugerat următoarea expresie fenotipică a genelor:

— *nif* H, *nif* D, *nif* K — gene structurale pentru nitrogenază, transcrise în această ordine; genele *nif* D și *nif* K codifică subunitățile proteinei Mo—Fe, iar *nif* H codifică subunitatea proteinei Fe;

— *nif* A — genă reglatoare;

— *nif* B — genă implicată în sinteza proteinei Mo—Fe;

— *nif* F — genă care codifică o proteină transportoare de electroni;

— *nif* J — genă care codifică o proteină cu rol necunoscut.

La alte microorganisme fixatoare de azot (*Azotobacter vinelandii*, *Rhizobium*) organizarea genelor *nif* în cromozom nu este încă complet lămurită, dar se pare că ele nu se află într-o zonă unică, ci sînt repartizate în mai multe locuri.

Alături de cunoașterea localizării și rolului genelor *nif*, prezintă importanță și cunoașterea mecanismului de biosinteză a nitrogenazei. S-a constatat că atunci cînd bacteriile fixatoare de azot sînt cultivate în prezența unor cantități suficiente de azot fixat — azotați sau săruri de amoniu — biosinteza enzimei nu se mai produce, deoarece nu mai are loc transcrierea mesagerilor corespunzători. Pentru explicarea acestei represii a exprimării genei nitrogenazei s-a propus un model de sistem enzimatic în cascadă, în care un rol de prim-ordin revine glutaminsintetazei (GS). Această enzimă mediază formarea glutaminei, rezervorul de amoniu pentru biosinteza a numeroase substanțe organice

azotate. Se pare însă că GS nu este decât un element din complicatul mecanism de reglare a biosintezei nitrogenazei la fixatorii liberi.

Problema biosintezei sistemului nitrogenazic în cadrul simbiozelor de tip *Rhizobium* — leguminoase (cu rol major în agricultura mondială, ele fiind independente de aportul de îngrășăminte chimice azotate) este cu mult mai complexă decât în cazul microorganismelor fixatoare libere (de exemplu *Klebsiella pneumoniae*) și trebuie spus că, spre deosebire de progresele înregistrate în cunoașterea geneticii bacteriilor din grupul *Rhizobium*, cunoștințele asupra participării genomului plantei-gazdă sînt mult mai reduse. În acest caz s-au descris relativ puține gene, iar funcționarea lor este în mare parte necunoscută.

## X.2.2. Posibilități de valorificare a fixării biologice a azotului

Sarcinile din ce în ce mai mari privind sporirea producției agricole, în condițiile penuriei tot mai accentuate a resurselor energetice convenționale, au impus necesitatea creării de noi soiuri de plante de interes economic major, soiuri care să fie capabile să fixeze azotul atmosferic fie prin simbioză cu bacterii fixatoare, fie singure — prin asimilare directă de către celulele proprii. În acest scop, s-au propus mai multe variante.

**X. 2.2.1. Ameliorarea unor asociații simbiotice naturale.** În ultima vreme s-au detectat — chiar și în țara noastră — microorganisme din genul *Azospirillum*, care trăiesc pe suprafața sau în interiorul rădăcinilor unor cereale (grâu, porumb) sau ale unor graminee furajere. Aceste bacterii au capacitatea de a fixa azotul atmosferic. Prin inginerie genetică s-a reușit obținerea unor tulpini hiperfixatoare de azot, tulpini ce dau mari speranțe de aplicabilitate practică.

**X. 2.2.2. Transferul genelor *nif* de la celule procariote la celule eucariote.** O altă cale de ameliorare genetică a unor plante pe baza tehnologiei DNA recombinant, prin care se speră crearea unor soiuri noi, capabile să fixeze azotul atmosferic în mod autonom, o reprezintă transferul regiunii genelor *nif*, sub controlul cărora se află biosinteza nitrogenazei (responsabilă de fixarea azotului liber) de la bacterii la plante superioare. De menționat că, pînă în prezent, prin intermediul plasmidelor s-a reușit doar:

— transferul și exprimarea genelor *nif* de la o gazdă bacteriană (*Klebsiella pneumoniae*) la gazde bacteriene înrudite (tot din familia *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella typhimurium*), care au mecanisme de protecție față de oxigen, precum și informația genetică auxiliară necesară pentru fixarea azotului molecular;

— transferul genelor *nif* la gazde bacteriene neînrudite (*Agrobacterium tumefaciens*, o mutantă nefixatoare de *Azotobacter vinelandii*);



În acest caz transferul a reușit doar la *Asotobacter*, celorlalte specii lipsindu-le — probabil — sistemul protector față de oxigen. Aceste încercări de transfer au un caracter mai mult teoretic, decât practic, deoarece este de presupus că introducerea în sol a noilor specii bacteriene, obținute pe această cale, nu ar duce la creștere semnificativă a azotului fixat, în ideea că supraviețuirea și multiplicarea acestor microorganisme nu ar avea de suferit.

Ca atare, pe baza experienței acumulate se speră că în viitor se va ajunge și la transferul direct al genelor *nif* de la procariote în celulele plantelor eucariote. Trebuie însă precizat că introducerea genelor bacteriene în plantele superioare este stânjenită de anumite bariere naturale care se manifestă la nivelul penetrării în celula vegetală, al menținerii și exprimării lor corecte, al replicării și repartiției în celule. O parte din aceste impedimente vor putea fi depășite grație culturilor de protoplaști lipsiți de perete celular și care pot îngloba macromolecule, organe celulare sau organisme monocelulare. Ulterior protoplaștii fuzionați pot reface plante întregi. O altă posibilitate de transfer a genelor *nif* la plantele superioare o oferă unele virusuri ale plantelor (de exemplu, virusul mozaicului conopidei) sau unele plasmide existente în mod natural, cum ar fi plasmida Ti (din *Agrobacterium tumefaciens*). Folosirea acestor vehicule întâmpină însă o oarecare rezistență deoarece pe această cale s-ar putea răspândi unele boli la plante.

Pe baza materialului prezentat se poate deci afirma că, la ora actuală există posibilitatea de a proiecta obținerea unor plante noi, fixatoare directe de azot molecular din atmosferă, care să realizeze recolte bogate fără să aibă nevoie de fertilizatori chimici pe bază de azot.

### X.2.3. Alte perspective

Un alt proiect în curs de realizare este transferul la plantele sensibile la frig a genelor care conferă rezistența la frig. Plecând de la constatarea că există citrice rezistente la frig, dar care produc fructe cu gust neplăcut, se urmărește izolarea genelor responsabile de această proprietate pentru a le transfera la portocali. Se speră ca în acest fel aria de cultivare a portocalilor să fie extinsă spre zone cu climă rece. De fapt problema rezistenței la frig a plantelor are implicații în domeniul cultivării lor, izolarea și transferarea genelor specifice având multe consecințe economice pozitive.

În concluzie, se poate aprecia că ingineria genetică oferă o bază reală pentru obținerea de noi soiuri de plante cu proprietăți dintre cele mai variate și utile: rezistență la boli și la frig, capacitatea de a folosi autonom azotul atmosferic, valorificarea energiei solare, recolte sporite etc.



### X.3. În domeniul industrial biotehnologia va înlocui petrochimia?

Anul acesta (1980) s-a decis ca „noile forme de viață” create de om prin inginerie genetică — în special bacterii — să poată fi brevetate ca orice invenție sau descoperire. Prin această hotărâre se consideră că a fost pusă baza juridică a ceea ce, pe bună dreptate, s-a numit „revoluția biologică”. Momentul „izbucnirii” acestei revoluții poate fi considerat anul 1953, când s-a descris pentru prima dată structura DNA de către Watson și Crick, iar momentul ei culminant se situează douăzeci de ani mai târziu, adică în 1973, când s-a descris pentru prima oară tehnologia DNA recombinant.

Dezvoltarea impetuoasă a acestei tehnologii, cu ajutorul căreia s-a realizat distrugerea barierelor naturale dintre specii, a avut ca rezultat impactul direct dintre biologie și industrie, asemănător celui produs anterior de fizică. Acest impact a determinat ca o serie de state să investească sume apreciabile în dezvoltarea biotehnologiei \*. Pentru a cita un singur exemplu, numai țările Pieței comune au un proiect în valoare de 16 milioane lire pentru dezvoltarea biotehnologiei în perioada 1981-1985. Principalele firme industriale care se ocupă de producția unor medicamente cu ajutorul microorganismelor modificate prin tehnologia DNA recombinant sînt: „Genentech” (San Francisco, S.U.A.), fondată în 1976, axată pe producția de somatostatina, insulină; „Ely Lilly” (S.U.A.) — producție de insulină; „Cetus” (Berkeley, S.U.A.) — producție de alcooli; „Genex” (Bethesda, S.U.A.) — producție de coloranți, detergenți, cauciuc sintetic; „Biogen” fondată în 1979, societate internațională cu fonduri americane — producție de interferon; „Searle” (Anglia) — producție de antigene virale; „Transgène” (Strasbourg, Franța) fondată în 1980.

#### X.3.1. Industria fermentativă și problema energiei

După cum se știe, industria fermentativă bazată pe procedeele convenționale de microbiologie industrială produce de foarte mulți ani aminoacizi, proteine, nucleotide, alți compuși organici. Problema care se pune cu acuitate în prezent este adaptarea acestei industrii și la obținerea de produși noi, sintetizați de microorganismele nou create prin tehnologia DNA recombinant. În plus, apare și problema elaborării unor tehnologii bazate pe surse noi de biomasă, întrucît produsele

\* *Biotehnologie* — toate tehnologiile industriale care au la bază procese biologice. (Menționate într-un articol foarte recent elaborat de Hartley, B. — *Nature* 283, 122 (1980).

petrochimice devin din ce în ce mai scumpe. În momentul de față biotehnologia aduce o contribuție importantă la rezolvarea problemei energetice. Cu ajutorul ei se produc deja din biomasă vegetală cantități mari de alcooli, utilizați ca înlocuitori ai benzinei. Se speră însă că, în curând, procedeele convenționale din acest domeniu să fie mult îmbunătățite. Astfel, se studiază posibilitatea realizării fermentației de către microorganisme care trăiesc la temperaturi ridicate. Avantajul major al tehnologiilor de acest fel este că distilarea alcoolului o realizează chiar căldura degajată în cursul fermentației. În consecință, procesul de obținere al alcoolilor devine mai rapid, cu un consum minim de energie.

Un alt proiect în curs de realizare, tot prin fermentație, este conversia celulozei la combustibili lichizi sau gazoși, proces cu ajutorul căruia unele țări europene speră să rezolve o parte a problemelor balanței lor energetice.

Bioconversia energiei solare ar fi o alternativă pentru rezolvarea marilor dificultăți create de criza petrolului. Ea constă în fixarea energiei solare cu ajutorul unor plante sau alge fotosintetice. Ameliorarea acestor microorganisme prin tehnologia DNA recombinant, cu îmbunătățirea randamentului de fixare a energiei luminoase și calorice, le va transforma în adevărați convertizori de energie. Din biomasa acestor microorganisme, energia se poate recupera ușor prin fermentație, obținându-se alcooli care pot substitui cu succes petrolul.

### X.3.2. Industria alimentară

În momentul de față, în alimentația animalelor se folosește ca supliment — în afară de proteina de soia — și proteina sintetizată de unele microorganisme special selecționate și cultivate. Aceste microorganisme, denumite pe scurt SCP (*Single Cell Protein*), realizează de fapt conversia unor produși secundari în industria petrochimică în proteine. Astfel, procedeul firmei „British Petroleum” folosește pentru cultivarea SCP *n*-alcani obținuți la rafinarea petrolului, firma „Shell” folosește metanul, iar „Imperial Chemical Industries” (ICI) utilizează în același scop metanolul. Se consideră că, din punct de vedere economic, procedeul pus la punct de către ICI este cel mai rentabil. Foarte recent însă, cercetătorii acestei firme, aplicând tehnicile DNA recombinant au reușit să îmbunătățească producția de SCP și prin aceasta conversia metanolului în proteină.

Cum s-a realizat îmbunătățirea conversiei? Pentru a sintetiza proteina microorganismele au nevoie de azot molecular. În mod obișnuit SCP îl obține din amoniac. S-a observat că tulpina de SCP denumită AS<sub>1</sub> asimilează amoniac pe o cale metabolică energetic ineficientă, utilizând pentru conversia amoniacului în glutamat enzima glutamatsin-

tetază. Energia necesară a acestei conversii se obține însă prin oxidarea metanolului la  $\text{CO}_2$ , ceea ce determină un consum excesiv de metanol. Considerându-se că există organisme care folosesc alte căi metabolice mult mai avantajoase din punct de vedere energetic, pentru conversia amoniacului în glutamat cu ajutorul glutamatdehidrogenazei, s-a construit o nouă tulpină bacteriană, care a primit gena glutamatdehidrogenazei în locul genei glutamatsintetazei. Din fericire, bacteria *E. coli* — care este foarte bine cunoscută — conține gena dorită, așa că gena a fost excizată de aici și introdusă în tulpina  $\Delta\text{S}_1$  de SCP. Mai greu a fost să se izoleze un mutant care să aibă deleția genei glutamatsintetazei. În urma unor cercetări s-a descoperit un mutant termosensibil, la care gena glutamatsintetazei nu operează la temperaturi mai mari de  $37^\circ\text{C}$ . La acest mutant s-a grefat gena glutamatdehidrogenazei, iar tulpina nou obținută (care s-a dovedit a fi stabilă) folosește calea metabolică a glutamatdehidrogenazei la temperaturi de peste  $37^\circ\text{C}$ . Pe baza acestei modificări randamentul conversiei metanolului în proteină a crescut cu 5%. De precizat că proiectul privind producția SCP a fost lansat în 1968, iar în anul 1976 s-au aprobat 40 milioane lire sterline pentru construcția instalațiilor necesare producerii SCP.

Tot prin tehnologia DNA recombinant se încearcă modificarea microorganismelor superproducătoare de enzime speciale, necesare în industria alimentară. După eliberarea din celule, aceste enzime sînt imobilizate (sau chiar celulele avînd în interiorul lor enzimele de interes sînt imobilizate) și utilizate drept catalizatori în diferite procedee industriale. Un astfel de exemplu este procedeul de obținere a siropurilor de fructoză, cu glucozoizomerază, imobilizată, procedeu utilizat de mai multe firme din S.U.A. și Anglia.

De menționat și faptul că în momentul de față cercetătorii britanici studiază posibilitatea utilizării tehnologiei DNA recombinant la producția taumatinei, o substanță proteică care este de 2500 ori mai dulce decît o soluție de zahăr 10%. Este important de reținut că taumatina, izolată din fructele de *Taumatococcus danielli* (care crește în Africa și a fost descoperit în 1968) nu este toxică. Datorită proprietăților ei deosebite, taumatina este din ce în ce mai mult solicitată pe piața mondială, motiv pentru care se caută îmbunătățirea producției sale.



## XI. Biohazardul și măsurile de protecție în tehnologia DNA recombinant

Dacă pînă acum cîțiva ani se putea spune că raporturile dintre oamenii de știință și cetățeni erau, în mod esențial, amicale, în ultimul timp asistăm la unele dispute între aceste categorii de oameni, datorită mai ales consecințelor negative pe care le poate genera ingineria genetică. Aceasta, în principal, deoarece cunoștințele moderne de biotehnologie nu elimină posibilitatea ca microorganismele transformate prin această tehnologie să devină periculoase pentru om și mediul înconjurător. În acest context merită să menționăm conflictul declanșat între Universitatea Harvard și primăria orașului Cambridge (S.U.A.), privind construirea unui laborator de biotehnologie. La baza disputei a stat pe de o parte, dorința oamenilor de știință de a utiliza biotehnologia pentru obținerea de noi informații despre materia vie, de a găsi noi surse de hrană, energie, medicamente etc., iar pe de altă parte, oponenții ei au susținut pe bună dreptate, că aceste cercetări trebuie oprite, întrucît — în momentul de față — nu se pot da garanții absolute de securitate.

Pînă foarte recent, oamenii de știință considerau că nu există nici un argument experimental care să susțină potențialul de biohazard al ingineriei genetice. O dată însă cu izbucnirea „afacerii Birmingham” \*, care a costat viața a două persoane, datorită instalațiilor defecte ale

---

\* „Afacerea Birmingham” — cum este denumită de ziariști situația tragică petrecută la Universitatea din Birmingham — a constat, succint, în următoarele: profesorul Bedson, efectuînd în secret în laborator cercetările sale, a creat prin inginerie genetică un hibrid de virus variolic. Acest virus se pare că a reușit să scape din laboratorul profesorului Bedson (faptul nu a putut fi dovedit datorită instalațiilor defecte ale laboratorului (ceea ce s-a dovedit a fi real!)). Se pare că acest virus a ajuns în încăperea de la etajul superior laboratorului, unde a produs moartea fotografei Janet Parker. Conștient de greșelile pe care le-a făcut, profesorul Bedson și-a pus capăt zilelor.

unui laborator în care se făceau experiențe de inginerie genetică, a apărut evident pericolul generat de aceste cercetări. Cazul acesta a atras atenția atât asupra riscurilor pe care le poate genera ingineria genetică, cât și asupra cercetărilor clandestine, care se pot efectua în diferite laboratoare și care ar putea fi folosite în scopuri teroriste sau de șantaj.

Se pune deci problema ca, în cazul în care aceste cercetări continuă, să se ia măsuri de protecție eficiente, care să protejeze față de biohazard atât personalul de cercetare, cât și publicul larg, plantele și animalele din mediul înconjurător.

Trebuie precizat de la început că toate instituțiile medicale, veterinare, fitopatologice, microbiologice și virusologice, care lucrează cu materiale biologice periculoase au experiență îndelungată în manipularea acestor materiale. În consecință, laboratoarele instituțiilor menționate, antrenate în cercetări cu virusuri sau microorganisme, au fost astfel construite și amenajate încât ele să ofere garanția nediseminării în mediul înconjurător a germenilor patogeni. Dealtfel, primele cercetări de inginerie genetică au fost efectuate în astfel de laboratoare. În momentul în care progresele ingineriei genetice au permis transferarea genelor de la un organism la altul, indiferent de specia de organism din care provin, și deci crearea unor organisme neîntâlnite în natură având proprietăți noi, a apărut necesitatea adoptării unor măsuri suplimentare de securitate, care să corespundă situației noi create. În acest scop, s-a formulat așa-zisa protecție biologică și fizică (*biological and physical containments*).

*Protecția biologică* presupune folosirea vectorilor sau/și a gazdelor care, datorită unor mutații sau altor cauze, sînt modificate sau „mutilate” (*crippled*), în așa fel încît microorganismele conținînd material genetic schimbat prin inginerie genetică devin incapabile de a supraviețui în natură. Tulpina de bacterie *E. coli K12* este un exemplu tipic, care îndeplinește aceste condiții.

*Protecția fizică* presupune folosirea unor laboratoare special amenajate, dispozitive tehnice și fizice de manipulare sigură pentru cercetările de inginerie genetică, care să asigure protecția personalului de lucru al laboratorului, a publicului, cât și a mediului înconjurător față de agenții patogeni, de orice risc de contaminare cu agenți cu care se operează. În funcție de gradul de periculozitate pe care îl implică cercetările, condiționat de materialele cu care se lucrează, s-au stabilit

diferite tipuri de laboratoare pe care le vom descrie după ce vom reda mai întâi principalele restricții generale, care se impun în astfel de cercetări.

## XI.1. Măsuri generale de protecție

Foarte recent, au apărut sub auspiciile Academiei de Științe a U.R.S.S. „Principiile călăuzitoare provizorii în manipulările DNA recombinant” \*, document care a fost întocmit pe baza unor materiale asemănătoare, apărute în S.U.A. (N.I.H.-Guidelines), Anglia, Franța și Olanda, precum și pe baza altor rapoarte și publicații, ocupându-se cu potențialul de hazard al DNA recombinant. Documentul acesta a fost redactat cu doi ani mai târziu decât N.I.H.-Guidelines (iunie 1976), iar în plus însumează și ține cont și de recomandările altor foruri științifice naționale și internaționale, motiv pentru care vom reda principalele norme prescrise pentru protecția generală.

Primul principiu general al măsurilor de protecție constă în respectarea cu strictețe a recomandărilor și a tehnicilor stabilite de protecția microbiologică. În conformitate cu acest principiu sînt acceptate să lucreze cu DNA recombinant numai acele persoane care au o pregătire medicală, au fost inițiate și instruite în tehnicile aseptice și în biologia generală a microorganismelor, astfel încît înțeleg și pot evalua potențialul biohazardului. Această instruire trebuie să fie dovedită printr-un certificat.

În continuare se recomandă respectarea strictă a următoarelor măsuri de securitate:

1) în timp ce se efectuează un experiment ușile laboratorului trebuie păstrate închise;

2) personalul trebuie să poarte uniforme speciale;

3) este interzisă păstrarea atît a hranei, cît și a băuturii în acest laborator;

4) se vor utiliza dispozitive mecanice pentru pipetarea probelor de cultură;

5) rezidiile solide și lichide, conținînd DNA recombinant, sau cele care au fost în contact cu el, vor fi plasate în containere speciale și apoi decontaminate;

6) animalele neîntrebuințate în experiențe vor trebui îndepărtate din laborator;

\* „Provisional Guidelines on recombinant DNA manipulation”, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, 1978.



- 7) suprafețele potențial contaminate vor fi decontaminate cu un dezinfectant la terminarea programului de zi și imediat în cazuri de urgență, după o răspîndire accidentală a DNA recombinant;
- 8) camerele vor fi ferite de insecte și rozătoare.

## XI.2. Protecția biologică

Cercetătorul poate și chiar este obligat de normele de securitate a muncii să micșoreze considerabil potențialul de biohazard al lucrărilor sale cu DNA recombinant, prin alegerea atît a vectorilor (plasmide, bacteriofagi, virusuri), cît și a celulelor-gazdă adecvate și de tip inofensiv. Prin vectori și celule-gazdă inofensive se înțeleg acei vectori sau celule ale căror proprietăți îi determină să nu poată supraviețui și disemina în mediul înconjurător sau care nu posedă nișă ecologică în om, animale și plante, într-o anumită zonă geografică.

În momentul de față, tulpina de *Escherichia coli* K12 este considerată a fi bacteria care oferă maximum de securitate pentru cercetările de DNA recombinant. De foarte mulți ani ea este minuțios studiată și în consecință proprietățile ei biologice (la fel și structura ei genetică) sînt mai bine cunoscute decît cele ale oricărui alt microorganism. Această bacterie nu colonizează în mod uzual intestinul normal și, ca atare, este puțin probabil ca ea să fie convertită într-o formă patogenă prin manipulările efectuate cu DNA recombinant, motiv pentru care se recomandă folosirea ei în astfel de cercetări.

Un alt sistem gazdă-vector, care în ultimul timp cîștigă din ce în ce mai mult atenția cercetătorilor, este forma asporogenă de *Bacillus subtilis* care, de asemenea, nu are nișă ecologică la om.

### XI.2.1. Diferitele nivele de protecție biologică

Normele existente de protecție biologică recomandă trei nivele diferite de protecție.

Primul nivel este denumit  $B_1$  (de la cuvîntul englezesc *biological*) sau  $HV_1$  (*host-vector*) sau  $EK1$  (*E. coli* K). Acesta presupune utilizarea tulpinii standard de *E. coli* K12, respectîndu-se normele de protecție obișnuite dintr-un laborator cu o bună practică în manipularea materialului microbiologic.

Al doilea nivel, denumit pe scurt  $B_2$  sau  $HV_2$  sau  $EK2$ , se referă la obligația de a folosi tulpina  $K12$  „mutilată” (*crippled*) genetic, astfel încât cultivarea ei este posibilă numai în condiții special create în laborator. Supraviețuirea ei în afara laboratorului este considerată esențial imposibilă.

Al treilea nivel de protecție ( $B_3$ ,  $HV_3$ ,  $EK3$ ) este rezervat cercetărilor de tip  $B_2$  care sînt efectuate pe animale și/sau în nișa lor ecologică naturală.

### XI.3. Protecția fizică

Pentru a asigura o protecție a personalului, publicului și a mediului înconjurător, cercetările cu DNA recombinant se desfășoară în mod obligatoriu cu tehnici și instalații speciale. Totodată, întreg personalul trebuie să fie astfel instruit încît să poată folosi toate dispozitivele, în orice situație. În scopul îmbunătățirii protecției fizice se recomandă automatizarea lucrărilor experimentale.

Liniile directe de cercetare a DNA recombinant, trasate de Institutul Național de Sănătate a Statelor Unite (N.I.H.), Raportul Partidului Laburist din Anglia asupra „Practicii Manipulărilor Genetice”, recomandările Academiei de Științe a U.R.S.S., precum și recomandările Fundației Europene de Științe, prevăd patru nivele de protecție fizică ( $P$ ). Canada, spre deosebire de aceste organisme, recomandă chiar șase nivele de protecție fizică. În cele ce urmează vom prezenta, în mod succint, în ce constau cele patru nivele de protecție fizică.

*Primul nivel (minimal)* —  $P_1$ . Cercetările care se desfășoară la nivelul de protecție  $P_1$  nu au nevoie de amenajări speciale, în afară celor necesare unui laborator obișnuit de microbiologie. În acest caz, laboratorul nu este separat de celelalte încăperi prin dispozitive de filtrare, comunicare sau ventilare. Accesul în laborator este permis chiar și altor persoane, care nu lucrează în această unitate.

*Al doilea nivel (scăzut)* —  $P_2$ . În linii mari, laboratorul de tip  $P_2$  este construit după un model asemănător cu cel al laboratorului de tip  $P_1$ . Spre deosebire însă de acesta din urmă, accesul în laboratorul  $P_2$  este limitat și, în plus, el trebuie să conțină unele dispozitive suplimentare, care să împiedice răspîndirea aerosolilor în mediul înconjurător. Cu toate că, practic,  $P_2$  nu presupune existența în laborator a unui echipament de filtrare a aerului, de ventilație și sterilizare cu ultraviolete a materialului biologic, se recomandă ca unele operații să se desfășoare

șoare în cabinete de protecție biologică, echipate cu presiune de aer negativă, care să reducă la minimum posibilitatea răspândirii materialelor conținând DNA recombinant. În localul în care se găsește laboratorul de tip  $P_2$  trebuie să existe și o autoclavă.

*Al treilea nivel (moderat) —  $P_3$ .* Cercetările care se desfășoară la nivelul al treilea de protecție fizică presupun existența unui laborator special construit în acest scop, care să fie separat de celelalte arii ale clădirii prin uși sigilate. Pereții, tavanul și pardoseala trebuie să fie ușor de spălat, iar în aria laboratorului să existe o autoclavă. În interiorul laboratorului trebuie să existe presiune de aer negativă, iar aerul din încăpere să fie trecut, în mod obligatoriu, printr-un sistem de ventilație cu filtre speciale, pentru a-l purifica înainte de a-l îndepărta în mediu.

Laboratorul impune, de asemenea, respectarea de către personalul propriu a unor măsuri speciale de decontaminare și igienă, o îmbrăcăminte de protecție specială, afișarea pe ușa laboratorului a simbolului universal de biohazard, pătrunderea în încăperă numai a persoanelor autorizate, precum și multe alte obligații.

*Al patrulea nivel (înalt) —  $P_4$ .* În acest caz este vorba de un laborator special construit, care este astfel proiectat încât exclude posibilitatea microorganismelor cu potențial patogenic pentru om, animale și plante să poată scăpa din încăpere.

Un astfel de laborator este situat sau într-o clădire separată sau într-un compartiment al clădirii principale, care este total izolat de celelalte arii ale clădirii.

Pereții, plafonul și pardoseala sînt monolitice. Un sistem separat de ventilație menține o presiune de aer negativă în laborator, iar aerul este decontaminat înainte de evacuare. Ușile sînt comandate mecanic sau electromecanic, astfel încît să nu se deschidă simultan. Experiențele se desfășoară în cabinete ermetice, prevăzute cu sisteme de ventilație și filtrare a aerului, iar accesul în cabinete se face numai prin interiorul laboratorului.

Se asigură de asemenea ca intrarea și ieșirea personalului din unitate să se facă printr-un coridor „tampon”, special, care să comunice atît cu laboratorul cît și cu camerele speciale de schimbare a materialului de protecție.

În tabelul 18 redăm cîteva exemple privind condițiile de protecție fizică și biologică impuse de normele prescrise de „Liniile directe” pentru cercetările cu DNA recombinant, recomandate de Institutul Național de Sănătate al Statelor Unite (N.I.H. — Guidelines).



Cîteva exemple de protecție fizică și biologică în cercetările cu DNA recombinant, impuse de normele americane în vigoare

Protecția biologică (numai pentru sistemul <i>E. coli</i> -gazdă)	
	<div> <div>EK1</div> <div>EK2</div> <div>EK3</div> </div>
P <sub>1</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA din procariote nepatogene, care schimbă în mod natural gene cu <i>E. coli</i>.</li> <li>- DNA din plasmide sau bacteriofagi izolați din celule care schimbă în mod natural gene cu <i>E. coli</i>. Dacă genomul plasmidei sau bacteriofagului conține gene periculoase sau dacă segmentul de DNA are o puritate mai mică de 99% și nu este caracterizat se impune un grad superior de protecție.</li> </ul>
Protecția fizică	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA din celule embrionare sau linii germinative aparținând vertebratelor cu sin-ge rece.</li> <li>- DNA din alte animale cu sin-ge rece și eucariote inferioare (exceptînd insecte menținute în laborator pen-tru o perioadă mai mică de 10 generații).</li> <li>- DNA din plante (excep-tînd plantele care conțin patogeni cunoscuți sau care produc toxine cunoscute)</li> <li>- DNA din procariote cu risc scăzut patogen, care schim-bă natural gene cu <i>E. coli</i></li> <li>- DNA din organelele din eucariote. Pentru un DNA din organele, care este mai puțin de 99% pur, sînt necesare grade superioare de protecție.</li> </ul>
P <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA din vertebrate cu sin-ge rece neembrionare</li> <li>- DNA din procariote cu pa-togenicitate moderată, care schimbă în mod natural ge-ne cu <i>E. coli</i>.</li> <li>- DNA din procariote nepa-togene, care nu schimbă în mod natural gene cu <i>E. coli</i></li> <li>- DNA din virusurile plan-țelor</li> <li>- DNA din organelele pri-matelor (pentru DNA din organele, care este mai puțin pur de 99%, sînt necesare grade superioare de pro-tecție)</li> <li>- DNA din plasmide sau bac-teriofagi, din celulo-gazdă care nu schimbă natural gene cu <i>E. coli</i>. Dacă există, un risc ca recombinantul să mărească patogenicitatea sau potențialul ecologic al gazdei sînt necesare grade superioare de protecție.</li> </ul>

Tabelul 18 (continuare)

Protecția biologică (numai pentru sistemul <i>E. coli</i> -gazdă)	
	<div> <div>EK1</div> <div>EK2</div> <div>EK3</div> </div>
Protecția fizică	<div> <div> <div>P<sub>1</sub></div> <div> <ul style="list-style-type: none"> <li>— DNA din procariote nepatogene, care nu schimbă natural gene cu <i>E. coli</i></li> <li>— DNA din virusurile plantelor</li> <li>— DNA din plasmide sau bacteriofagi din celule-gazdă care nu schimbă natural gene cu <i>E. coli</i>. Dacă există riscul ca recombinantul să mărească patogenicitatea sau potențialul ecologic al gazdei sînt necesare grade superioare de protecție.</li> </ul> </div> </div> <div> <div> <div>P<sub>2</sub></div> <div> <ul style="list-style-type: none"> <li>— DNA din linii celulare germinative sau țesuturi primare embrionare</li> <li>— DNA din alte celule de mamifere</li> <li>— DNA din păsări</li> <li>— DNA din embrioni sau neembrionar din linii celulare germinative de vertebrate (dacă vertebratele produc o toxină)</li> <li>— DNA din procariote cu risc patogen moderat, care nu schimbă natural gene cu <i>E. coli</i></li> <li>— DNA din virusurile animalelor (dacă DNA clonat nu conține gene periculoase)</li> </ul> </div> </div> </div> </div>
	<div> <div> <div>P<sub>3</sub></div> <div> <ul style="list-style-type: none"> <li>— DNA din țesuturi primare neembrionare</li> <li>— DNA din virusuri animale (dacă după clonare nu conține gene periculoase)</li> </ul> </div> </div> </div>

## Bibliografie

1. N.I.H.—*Guidelines Research Involving Recombinant DNA Molecules* June (1976), U.S. Government Printing Office, Washington (D.C.).
2. Grobstein C. *The Recombinant DNA Debate*, Scientific American, 22, 237 (1977).
3. *Recomandările Fundației Europene de Știință privind cercetările cu DNA recombinant* (26 oct. 1976).
4. *Recombinant DNA Research: Survey of International Activities* (1978).
5. *Provisional Guidelines on Recombinant DNA Manipulation*, Academia de științe a U.R.S.S., Moscova (1978).

## APENDIX

### Principalele metode utilizate pentru construirea moleculelor de DNA recombinant

Cultivarea bacteriilor purtătoare de plasmide (după Colman și colab., 1978); Popa și colab. (1980).

Metoda rapidă și directă de identificare a DNA plasmidic în bacterii (după Eckhardt, 1978).

Metode de izolare și purificare a principalelor vehicule:

— Metoda de izolare a DNA plasmidic (după Bazaral și Helinski, 1968)

— Metoda generală de izolare a DNA plasmidic (după Guerry, Le Blanc și Falkow, 1973).

— Purificarea rapidă a DNA plasmidic prin cromatografie pe hidroxiapatită (după Colman și colab., 1978).

— Extracția DNA plasmidic (după Popa și colab., 1980).

— Metoda de extracție și purificare a DNA din virusul SV40 (după Sol și colab., 1975).

Metode de izolare și purificare a enzimelor de restricție:

— Metoda de purificare a enzimei de restricție *EcoRI* (după Yoshimori, 1973).

— Metoda generală pentru izolarea și purificarea enzimelor de restricție (după Greene și colab., 1978).

Metoda de purificare și testare a ligazei *T4* necesară construirii de molecule de DNA recombinant (după Moore și James, 1976).

Transformarea celulelor de *E. coli* K12 cu DNA plasmidic (după Berg și colab., 1976).

Metode de construire a moleculelor de DNA recombinant:

— Metoda generală de construire a unor DNA recombinanți (după Clarke și Carbon, 1975).

— Metodă de construire a unui DNA recombinant conținând gena pentru sinteza somatostatinei (după Itakura și colab., 1977).

Cultivarea bacteriilor purtătoare de plasmide  
(după Colman și colab., 1978)

*Materiale și metode.*

*Tulpini bacteriene și plasmide folosite.* S-au folosit tulpinile bacteriene și plasmidele date în tabelul 19.



Tabelul 19

## Tulpini bacteriene și plasmide

Tulpină <i>E. coli</i>	Plasmidă	Masă moleculară · 10 <sup>-6</sup>
581 (thy <sup>-</sup> , str <sup>R</sup> )	Col E <sub>1</sub>	4,5
OS410 (str <sup>R</sup> , thi <sup>-</sup> )	362	3,1
OS410 (str <sup>R</sup> , thi <sup>-</sup> )	Col E <sub>1</sub> ::Tn7	13,8
SPA-0	V-	—
C61127 (trp <sup>R</sup> , BI, str <sup>R</sup> )	pML21	7,9
HB101	pX1r101	10,4
HB101	pX1108	12,7
HB101	pX1212	11,5

**Creșterea bacteriilor.** Din fiecare tulpină menționată în tabel (exceptie făcând cele HB101), cultivată pe plăci de agar, s-au desprins colonii cu care s-au inoculat 10 ml bulion nutritiv; creșterea a avut loc peste noapte la 37°C. Fiecare cultură s-a folosit ulterior pentru inocularea a 1 litru bulion *L* sau bulion *M-9*, (Horiuchi, Ohishimo-1966) suplimentate cu 1% „casamino acids” (Difco Ltd.) și 2% glucoză (pentru tulpina 581, în cursul cultivării, s-au adăugat și 20 μg timină/ml). Creșterea s-a făcut la 37°C, la o densitate optică la 260 nm de 0,6, adică o densitate de 3 · 10<sup>8</sup> celule/ml. S-a adăugat apoi cloramfenicol la o concentrație finală de 100 μg/ml, iar incubarea a mai continuat încă 20 ore. Dacă este necesară obținerea de DNA plasmidial marcat cu <sup>3</sup>H-timidină, la mediu s-a adăugat <sup>3</sup>H-timidină 500 μCi/l și 2-deoxiadenozină 2 mg/ml, odată cu cloramfenicolul. Plasmidele pX1212, pX1108 și X1r101 conțin inserții de DNA ribozomal de *Xenopus laevis*. Din bacteriile astfel obținute se izolează DNA plasmidic după tehnica lui Clewell și Helinski (1969).

**Cultivarea bacteriilor purtătoare de plasmide pBR322 și pBR313**  
(după Popa și colab., 1980)

**Medii de cultură și chimicale:**

1. Bulion cu peptonă din cazeină și peptonă din făină de soia, (Merck); 30 g/l.

**Compoziție:**

— peptonă din cazeină .....	17,0 g/l
— peptonă din făină de soia .....	3,0 g/l
D— (+) glucoză .....	2,5 g/l
— clorură de sodiu .....	5,0 g/l
— fosfat acid de potasiu .....	2,5 g/l

La acest bulion se adaugă 5% T.C. Yeastolato Difco.

2. Mediu cu agar pentru determinarea numărului de germeni, (Merck); 35 g/l.

**Compoziție:**

— extract de carne .....	3,0 g/l
— extract de drojdie .....	5,0 g/l
— peptonă din cazeină .....	15,0 g/l
— D(+) glucoză .....	1,0 g/l
— agar-agar .....	11,0 g/l

3. Ampicilină (în capsule);

4. Tetraciclină (în capsule); Intreprinderea de medicamente București

5. Cloramfenicol (în capsule).

#### *Tulpini de E. coli și plasmide utilizate:*

Tulpina PRC = 401 purtătoare a plasmidei *pBR313*;

Tulpina PRC = 400 purtătoare a plasmidei *pBR322*;

Tulpina PRC = 399 de control (fără plasmidă).

Aceste tulpini au fost oferite prin amabilitate de Dr. E. Lederberg (Plasmid Reference Center, Stanford, California, U.S.A.).

#### *Creșterea bacteriei.*

În prima zi, bacteria se inoculează în 2 ml mediu nr. 1 și se păstrează peste noapte la 37°C. A doua zi, o parte din bacteria care a crescut în cei 2 ml mediu nr. 1, servește ca inocul pentru mediul nr 2, turnat pe o placă Petri, mediu la care s-a adăugat antibioticul respectiv: ampicilină 50 μg/ml pentru tulpina PRC ≠ 401 cu plasmida *pBR313*; ampicilină 50 μg/ml și tetraciclină 20 μg/ml pentru tulpina PRC ≠ 400 cu plasmida *pBR322*. Se lasă peste noapte la 37°C. A treia zi, se ia câte o colonie și se inoculează în 10 ml mediu nr. 1. Incubația se face peste noapte la 37°C. A patra zi, mediul în care s-a dezvoltat bacteria, servește ca inocul în proporție de 1/100 sau 1/50, pentru amplificarea bacteriei în 400 până la 1000 ml de mediu nr. 1. Menționăm că agitarea culturii timp de 5 ore la 37°C favorizează multiplicarea bacteriei. Când turbiditatea mediului a atins valoarea de  $A_{260}$  nm 0,8 se adaugă cloramfenicol 180 μg/ml și se lasă peste noapte la 37°C, agitându-se în continuare. A cincea zi, bacteria se separă prin centrifugare (1 oră la 3 000 t/min).

### **Metoda rapidă și directă de identificare a DNA plasmidic în bacterii (după Eckhardt, 1978)**

*Principiul metodei.* Bacteriile purtătoare de plasmide sînt transformate în sferoplaști sub acțiunea lizozimului, iar sferoplaștii rezultați sînt lizați cu dodecilsulfat de sodiu (DDS), direct în gelul pentru electroforeză. Din lizatul obținut se separă apoi DNA plasmidic de DNA cromozomal sub acțiunea curentului electric.

Metoda este foarte sensibilă și rapidă. Ea se poate folosi pentru analiza unei singure colonii de celule.

*Metoda de lucru.* Liza bacteriilor gram-negative (de ex. *E. coli*) diferă întrucîtva de liza bacteriilor gram-pozitive (de ex. *B. subtilis*), motiv pentru care se prepară amestecuri diferite în cele două cazuri.

#### *a) Amestecul cu lizozim pentru bacterii gram-negative:*

— lizozim (Calbiochem, 7500 U/ml).

— RNază I (Worthington, 0,3 U/ml)

— BFA 0,05% în tampon TEB (Tris 89 mM — EDTA, Na<sub>2</sub> 12,5 mM — H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 8,9 mM pH = 8,2)

— Ficoll 400 000, 20% (Sigma)

RNaza se dizolvă inițial în CH<sub>3</sub>COONa 0,4 M pH = 4 la o concentrație de 10 mg/ml, și apoi se încălzește 2 min la 98°C, înainte de a dilua în amestecul cu lizozim.

#### *b) Amestecul cu lizozim pentru bacterii gram-pozitive:*

— lizozim (75 000 U/ml)

— EDTA, Na<sub>2</sub> 50 mM pH = 8,0

— NaCl 0,1 M

#### *c) Amestecul cu DDS pentru bacterii gram-negative:*

— DDS 0,2% în Tris 89 mM-EDTA, Na<sub>2</sub> 2,5 mM—H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 8,9 mM pH = 8,2

— Ficoll 400 000 10%

#### *d) Amestecul cu DDS pentru bacterii gram-pozitive:*

— DDS 2% în tampon TEB (v. mai sus)

— Ficoll 400.000 10%.

e) *Procedeul de electroforeză*. Se lucrează cu un aparat de electroforeză cu migrare verticală. Dimensiunile gelului sint:  $110 \times 140 \times 2,5$  mm, iar dimensiunile godeului de  $6,5 \times 15 \times 2,5$  mm. Tamponul: Tris 89 mM – EDTA,  $\text{Na}_2$  2,4 mM –  $\text{H}_3\text{BO}_3$  8,9 mM  $\text{pH} = 8,2$ ; concentrația agarozei 0,75–1,2%;

f) *Încărcarea și liza*: ca sursă de DNA plasmidic se folosesc fie colonii unice de pe plăcile Petri (de 24–72 ore), fie lichidele de cultură;

1) 1–2 colonii ( $10^7$ – $10^8$  celule) se iau de pe placă și se amestecă cu grijă în godeul plăcii de agaroză cu 15  $\mu\text{l}$  lizozim. Suspensia devine turbidă ușor. Bacteriile gram-negative se lasă 2–5 min la temperatura camerei, iar cele gram-pozitive 30–40 min;

2) deasupra stratului precedent se așează cu grijă 30  $\mu\text{g}$  DDS și se face apoi o foarte ușoară amestecare, așa încât straturile să nu dispară, ci să rămână limita lor de separare;

3) se mai adaugă 100  $\mu\text{l}$  soluție Ficoll 400.000 10% fără a deranja stratul viscos de DNA, care s-a format;

4) godeurile se închid cu agaroză (0,50%), apoi se pune tamponul în bac;

g) *Separarea electroforetică*: DNA plasmidic se supune electroforezei 60 min la 20 mA, și apoi 60–150 min la 40 mA (în funcție de masa moleculară a DNA plasmidic);

h) *Examinarea DNA*. După terminarea electroforezei, gelul se introduce într-o soluție de bromură de etidiu 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  timp de 15 min, după care se examinează în ultra-violet folosind filtre adecvate. Spoturile de DNA apar colorate în roșu, datorită complexului care se formează între DNA și bromura de etidiu.

i) *Recomandări*. În etapa 1) este important ca gelul să nu fie supraîncărcat cu celule. În etapa 2) se va evita amestecarea completă pentru a obține randamentul maxim de DNA plasmidic; în acest caz se produce o liză celulară parțială, care va fi completată în cursul electroforezei de migrarea DDS.

#### Varianta pentru DNA plasmidic din *Staphylococcus aureus*

Întrucât *Staphylococcus aureus* este rezistent la acțiunea lizozimului, în acest caz transformarea celulelor sale în sferoplaști se face sub acțiunea lysostophinei.

– cultura de peste noapte pe mediu solid a tulpinii *S. aureus* de studiat se produce pe același mediu și se incubează 4 ore la  $37^\circ\text{C}$ .

– cultura se suspendă în 5 ml tampon TES cu 25% sucroză, la o densitate de aproximativ  $5 \times 10^8$  celule/ml;

– se centrifughează 1,5 ml suspensie. Sedimentul se reia în 0,1 mg/ml lysostaphin. Incubare: 1 oră la  $37^\circ\text{C}$ .

– se adaugă 0,1 ml soluție 2% DDS pentru liza sferoplaștilor;

– se agită violent (Vortex) timp de 1,5 min pentru ruperea DNA cromozomal;

– se încarcă 35–50  $\mu\text{l}$  din lizatul obținut per godeu în strat de agaroză 0,8%, în tampon TEB (Tris 8,9 mM, EDTA 2,5 mM, acid boric 89 mM,  $\text{pH} = 8,3$ );

– se aplică tensiunea de 250 V pentru 16 ore;

– după debransarea curentului, stratul de agaroză se scoate din aparatul de electroforeză și se pune într-un litru de apă distilată la care s-a adăugat 0,1 ml soluție-bromură de etidiu 10 mg/ml; se ține 20 min;

– se trece stratul de agaroză în baie cu apă distilată pentru îndepărtarea excesului de bromură de etidiu și se menține pentru alte 20 min;

– se examinează stratul de agaroză prin transluminare cu lumină ultravioletă. Benzile DNA, datorită fixării bromurii de etidiu, apar colorate în roșu. Se fotografiază folosind filtre adecvate.



## Metode de izolare și purificare a principalelor vehicule

### Metoda de izolare și purificare a DNA plasmidic (după Bazaral și Helinski, 1968)

Se prepară o cultură bacteriană de 10–15 ml cu  $< 10^9$  celule/ml, marcate cu radioizotopi. Se spală apoi prin centrifugare de 2 ori cu tampon TES (NaCl 0,05 M, Tris 0,050 M, EDTA 0,005 M, pH 8,0), la 0°C. Sedimentul se resuspendă în 1 ml de amestec cu lizozim 1 mg – RNază 500  $\mu$ g – sucroză 100 mg în tampon TES, apoi se incubează 10 min la 37°C. Suspensia rezultată se răcește 10 min pe baie de gheață, iar în continuare se adaugă 0,5 ml de sarcozil 2% în apă. Se lasă la temperatura camerei și se amestecă prin aspirare-respingere prin pipetă. Se mai adaugă 1 ml tampon TES la temperatura camerei și se continuă aspirarea-respingerea cu o viteză de 0,3 ml/sec. Lizatul astfel tratat cu cromozomul rupt („sheared”) 2 ml se pune într-un tub cu 13,1 g CsCl, 4 ml bromură de etidiu (700  $\mu$ g/ml în tampon fosfat sodic 0,1 M pH 7,0) și 7,6 ml apă. Conținutul tubului se omogenizează și se centrifughează 44 ore la 44 000 rpm, la 20°C (Ti60 unghiular). În urma centrifugării, DNA plasmidic se separă sub forma unei benzi ușor de localizat în lumină ultravioletă. DNA se extrage din tub printr-o puncție laterală efectuată cu o seringă. DNA-ul astfel obținut se dializează și la nevoie se precipită cu alcool etilic pentru concentrare.

### Metoda generală de izolare a DNA plasmidic (după Guerry, Le Blanc și Falkow, 1973)

Metoda se aplică la izolarea plasmidelor cu masă moleculară cuprinsă între  $5,4 \times 10^6$  și  $65 \times 10^6$  daltoni. Tulpinile de *E. coli* K12 conținând plasmide de mase moleculare în domeniul menționat sînt crescute pînă la faza logaritmică în 30 ml mediu salin minimal suplimentat cu 0,5  $\mu$ g timină/ml, 250  $\mu$ g deoxiadenozină/ml 3  $\mu$ g  $^3\text{H}$ -timină/ml (cu 20 Ci/mM). Celulele se recoltează prin centrifugare și se suspendă într-un ml de sucroză 25% în tampon Tris 0,05 M pH 8,0. După adăugarea a 0,2 ml lizozim (5 ml/ml în tampon Tris 0,25 M pH 8,0) suspensia se lasă 5 min pe baie de gheață, iar apoi se adaugă 0,4 ml EDTA 0,25 M pH 8,0, continuîndu-se răcirea încă 5 min. Liza celulară completă se realizează prin adăugare de DDS la o concentrație finală 1%. Soluției viscoase rezultate i se adaugă NaCl 5 M pentru a avea concentrația finală de 1 M, se agită cu blindețe și apoi se lasă peste noapte. Pentru îndepărtarea — practic — a întregii cantități de DNA cromozomal (99%) se face o centrifugare de 30 min la 17 000 xg, la rece, în urma căreia DNA plasmidic rămîne în supernatant, iar DNA cromozomal sedimentează.

Metoda prezintă o serie de avantaje: nu este necesar ca plasmida să fie în forma CCI, pe de o parte, iar pe de altă parte este aplicabilă unor plasmide cu un domeniu larg de masă moleculară.

### Purificarea rapidă a DNA plasmidic prin cromatografie pe hidroxiapatită (după Colman și colab., 1978)

Colman și colab. au descris un procedeu de purificare a DNA plasmidic, care nu utilizează centrifugarea în CsCl și care în plus, este rapid, ieftin și permite obținerea de DNA de înaltă puritate. Principiul de bază constă în reținerea selectivă și reversibilă, pe coloană de hidroxiapatită, a unor molecule mici de DNA dublu catenar, în condiții care nu permit nici legarea vreunei specii de RNA, și nici legarea proteinelor.

**Prepararea lizatului clar.** Bacteriile obținute prin metoda descrisă anterior s-au recoltat prin centrifugare, timp de 30 min, la 2 500 rpm, la 4°C, a unui litru de cultură. Fiecare sediment bacterian s-a reluat în 4 ml sucroză 0,25 M cu  $\text{MgCl}_2$  2 mM,

iar lizatul clar s-a obținut prin metoda lui Clewell și Helinski: sedimentul resuspendat ca mai sus a fost incubat succesiv cu 0,8 ml de soluție de lizozim 20 mg/ml în tampon Tris 10 mM — HCl pH 8,0, timp de 5 min la 0°C, iar apoi cu 1,6 ml EDTA 0,25 M pH 8,0 încă 5 min la 0°C și final cu 6,4 ml Triton X-100 0,5% (g/v) în tampon Tris 50 mM — HCl pH 8,0 cu EDTA 0,0625 M timp de 20 min la 0°C. Probele s-au agitat ușor din 5 în 5 min. În unele cazuri, concentrația de EDTA poate varia în limitele 10 — 40 mM.

**Cromatografia pe hidroxiapatită.** Pentru cromatografia pe hidroxiapatită s-a folosit metoda descrisă de Britten și colab., care permite separarea DNA dintr-un amestec cu RNA și proteine. Pulberea de hidroxiapatită (Biorad, DNA grade) a fost suspendată în uree 8 M, în tampon fosfat sodic 0,24 M pH 6,8; s-a folosit cite 1 g hidroxiapatită pentru fiecare litru de cultură bacteriană. Suspensia a fost turnată într-o coloană de sticlă cu diametrul de 3 cm și s-a spălat cu două volume de uree 8 M în tampon fosfat sodic 0,24 M pH 6,8. Atât această etapă, cât și următoarele, se execută cu presiune pozitivă. 1,1 volume lizat clar s-au diluat cu 8,9 volume de uree 9 M în tampon fosfat 0,27 M cu DDS 0,9% pH 6,8, iar apoi proba s-a aplicat pe coloana de hidroxiapatită. Coloana s-a spălat cu uree 8 M în tampon fosfat sodic 0,24 M pH 6,8, până când  $E_{260}$  a fost practic 0. Prin coloană s-au mai trecut de 3 ori cite două volume tampon fosfat 0,01 M pH 6,8. Adăugarea de tampon fosfat 0,3 M pH 6,8 a dus la eluarea DNA plasmidic. Recuperarea DNA se poate urmări spectrofotometric sau prin metoda cu difenilamină a lui Burton. Șarjele de hidroxiapatită diferă foarte mult între ele, iar randamentul de obținere a DNA plasmidic variază între 0,5 și 5 mg.

**Centrifugarea în gradient de densitate, în prezența bromurii de etidiu.** Lizatele clare s-au pregătit pentru ultracentrifugarea în gradient de densitate prin adăugare de 1 g CsCl și a 0,1 ml bromură de etidiu (10 mg/ml) pentru fiecare ml de lizat. Soluțiile au fost ultracentrifugate 48 până la 60 ore la 40 000 rpm la 20°C în centrifugă MSE cu rotor angular 8×50 ml. După ultracentrifugare, banda fluorescentă mai densă care conține CCI DNA s-a recoltat, iar colorantul s-a îndepărtat prin extracții succesive cu alcool izoamilic saturat cu CsCl. Ulterior s-a procedat la dializa fracțiunilor contra tampon Tris 10 mM — NaCl 10 mM — EDTA 1 mM pH 7,6.

**Gel electroforeza.** Analiza DNA a fost făcută pe gel de agaroză 0,8% (Sigma tip II), pe placă cu dimensiunile 20 × 15 × 0,4 cm. Tamponul utilizat a fost Tris 18 mM —  $H_3BO_3$  18 mM — EDTA 3 mM pH 8,3 sau Tris 40 mM — acetat de sodiu 20 mM — EDTA 2 mM pH 8,3. Electroforeza s-a făcut la 120 V timp de 2 ore sau la 30 V timp de 15 ore. După terminarea electroforezei gelurile s-au îmbibat prin păstrare într-o soluție de bromură de etidiu 0,5 μg/ml, în tampon de electroforeză și au fost analizate în lumină UV, pentru punerea în evidență a benzilor.

## Extracția DNA plasmidic (după Popa și colab., 1980)

Pentru a evita, pe de o parte, centrifugarea în gradient de clorură de cesiu recomandată de metodele clasice, iar pe de altă parte, colmatarea coloanei de hidroxiapatită de către DNA cromozomal, care uneori deranjează serios separarea DNA plasmidic în cazul utilizării metodei lui Colman și colab. (1978), s-a propus următoarea variantă de separare a DNA plasmidic *pBR322* și *pBR313*.

Ea are două etape principale: a) obținerea lizatului clar; b) cromatografia pe coloană de hidroxiapatită a lizatului clar.

a) Lizatul clar s-a obținut prin metoda Clewell și Helinski (1969) modificată astfel: celulele rezultate dintr-o cultură de 400 ml s-au suspendat în 2 ml de zaharoză 25% în Tris/HCl 0,25 M pH 8. Apoi, au fost incubate cu 1,0 ml de lizozim (20 mg/ml) în Tris/HCl 0,25 M pH 8 timp de 5 min la 0°C; apoi cu 2,6 ml de EDTA 0,25 M pH 8 tot 5 min la 0°C și final cu un volum egal de Triton X-100 2,0% (g/v) în Tris/HCl 5 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8 timp de 20 min la 0°C. Amestecul a fost centrifugat timp de 60 min la 25 000 rpm cu rotor SW 50.1.



b) Cromatografia pe coloană de hidroxiapatită. Supernatantul obținut prin centrifugare a fost supus cromatografiei pe coloană de hidroxiapatită, preparată după metoda lui Tisselius și colab. (1956). Coloana a avut diametrul de 1,4 cm și a conținut 1 ml de suspensie de hidroxiapatită (echivalentul a 0,1 g substanță uscată) pentru 3 ml de supernatant.

Eluția s-a făcut discontinuu cu tampon fosfat de diferite molarități. Trecerea la molaritatea superioară s-a făcut în momentul în care transmisia la 280 nm a soluției eluate de pe coloană a atins valoarea maximă. S-a ales transmisia la 280 nm pentru a urmări îndepărtarea Tritonului X-100, cu maxim de sensibilitate.

În final, identificarea DNA plasmidic s-a făcut prin electroforeză în gel de agaroză. Maximul de eluție a DNA plasmidic s-a obținut la concentrația de fosfat 0,2 M.

#### Metoda de extracție și purificare a DNA din virusul SV40 (după Sol și colab., 1975)

Monostratul de celule BSC-1 infectate cu virus SV40 se desprinde de pe sticlă prin îngheț-dezgeț. Virusul și celulele se depun prin centrifugare cu rotor SW27 într-o ultracentrifugă Beckman la 27 000 rpm timp de 2 ore la 4°C. DNA viral se extrage selectiv prin metoda Hirt (1967): sedimentul celular și virusul se suspendă în EDTA sodic 10 mM pH 7,5, iar apoi se adaugă DDS la 0,6% și NaCl la 1 M. Lizatul se lasă peste noapte la 4°C. Lichidul supernatant se amestecă cu CsCl la o densitate de 1,55 g/ml, și se adaugă bromură de etidiu la o concentrație finală de 300 μg/ml. Amestecul este supus ultracentrifugării în rotorul SW50 la 44 000 rpm, timp de 40 ore, la 20°C. Banda inferioară care se vede se recoltează prin puncția laterală a tubului, iar bromura de etidiu se îndepărtează prin extracție cu alcool izoamilic și eter. După dializă contra tampon Tris 10 mM - HCl pH 7,5 cu EDTA, Na 1 mM, concentrația DNA se determină spectrofotometric.

#### Metoda de purificare a enzimei de restricție Eco RI (după Yoshimori, 1973)

**Purificare.** Tulpina de *E. coli* R.RI se cultivă pînă în faza semilogaritmică, moment în care se recoltează celulele. Se resuspendă apoi în tampon PEM (fosfat de potasiu 0,01 M pH 7,0 EDTA 0,001 M și 0,007 M β-mercaptoetanol) și se sparg în prezența unor bile de sticlă cu un vibrator. Extractul celular se centrifughează la 30 000 rpm timp de 105 min la 4°C într-un rotor tip Spinco 30. Supernatantul se tratează cu sulfat de streptomycină 2,5%. Precipitatul obținut se colectează prin centrifugare, iar supernatantul se ajustează la concentrații de 50% sulfat de amoniu. Precipitatul rezultat se colectează prin centrifugare și apoi se dizolvă în PEM căruia i s-a adăugat NaCl 0,2 M și a fost corectat la pH 6,5. Soluția se dializează față de PEM, pH 6,5 cu NaCl 0,2 M. Se pregătește o coloană de DEAE-celuloză care se echilibrează cu același tampon. Se introduce proba în coloană, iar eluția se face cu un gradient de NaCl cuprins între 0,2 și 0,75 M în tampon PEM pH 6,5. Frațiunile eluate între 0,38 și 0,48 M NaCl conțin enzima de restricție. Ele sînt suficient de pure pentru a fragmenta specific DNA λ sau alți DNA.

#### Metodă generală pentru izolarea și purificarea enzimelor de restricție (după Greene și colab., 1978)

Recent Greene și colab. au elaborat o metodă simplificată de purificare a enzimelor de restricție. Ea a fost verificată pentru purificarea următoarelor enzime: Alu I, Bam I, Bgl I, Bgl II, Eco RI, Eco RII, Hae II, Hae III, Hga, Hinc III, Hpa I, Hpa II, Hsu I, Pst I, Sal I, Taq. Practic, aproape toate enzimele de restricție pot fi purificate cu ajutorul acestei metode.



Enzimele astfel obținute au un grad ridicat de puritate și pot fi folosite pentru maparea fizică a DNA, determinări de secvențe de DNA și, ceea ce este extrem de important, în construcția de DNA recombinant. Este de notat că enzimele de restricție purificate sunt lipsite de alte nucleaze și fosfataze.

a) Tulpinile bacteriene și condițiile de creștere.

Datele sînt sintetizate în tabelul 20. Tulpinile de *Haemophilus* au fost cultivate într-un microfermentator tip New Brunswick 141 în următorul mediu: 37 g Brain heart infusions (BHI), 0,2 ml soluție stoc  $\text{NAD}^+$  și 10 ml soluție stoc hemină la litru. Soluția stoc de  $\text{NAD}^+$  (10 mg/ml) a fost sterilizată prin filtrare și păstrată la  $-20^\circ\text{C}$ . Soluția stoc de hemină (0,1% în 4% trietanolamină) a fost sterilizată 15 min la  $65^\circ\text{C}$  și s-a păstrat la  $4^\circ\text{C}$ . O cultură de 500 ml (rezultată prin inocularea unei singure colonii și crescută 16 ore) s-a folosit pentru însămînțarea a 12 l de mediu în microfermentator. Creșterea a continuat 5–7 ore la  $37^\circ\text{C}$ , cu o aerare de 11 l aer/min și amestecare de 3–500 rpm. Creșterea densității celulelor s-a măsurat cu un fotometru Klett-Summerson, cu filtru verde, iar celulele s-au recoltat prin centrifugare cînd densitatea lor a atins un platou (400–600 unități Klett).

Tabelul 20

Tulpinile bacteriene și condițiile lor de creștere

Enzima	Tulpina	Proveniența tulpinii*	Fermentator/ mediu	Randament
Alu I	<i>Arthrobacter luteus</i>	R.J. Roberts	Hi density/SLBH	280 g
Bam I	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	G. Wilson	Hi density/SLBH	55 g
Bgl I	<i>Bacillus globigii</i>	G. Wilson	Hi density/SLBH	60 g
Bgl II	<i>Escherichia coli</i>	H.W. Boyer	Hi density/SLBH	250 g
Eco RI	<i>pMB4</i>			
Eco RII	<i>Escherichia coli</i> RY22	H.W. Boyer	Hi density/SLBH	250 g
Hae II	<i>Haemophilus aegyptius</i>	R.J. Roberts	Microferm/BHI	55 g
Hae III	<i>Haemophilus gallinarum</i>	R.J. Roberts	Microferm/BHI	60 g
Hga	<i>Haemophilus influenzae c</i>	R.J. Roberts	Microferm/BHI	47 g
Hinc II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	H.W. Boyer	Microferm/BHI	60 g
Hpa I	<i>Haemophilus suis</i>	R.J. Roberts	Microferm/BHI	25 g
Hpa II	<i>Streptomyces albus</i>	—	Microferm/Zubay	—
Hsu	<i>Thermophilus aquaticus</i>	R.J. Roberts	Microferm/Castenholtz	22 g
Sal I				
Taq				

\* Tulpinile cultivate în Hi density/SLBH pot fi obținute și în microfermentator în mediu Zubay sau în alte condiții similare, apropiate tulpinilor în cauză.

*Streptomyces albus* a fost cultivat tot în microfermentator New Brunswick în mediu Zubay, care conține: 28,9 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 g extract de drojdie, 10 mg vit. B<sub>1</sub> la litru și 1% glucoză (autoclavată separat). 1 l de mediu s-au inoculat cu 1 l de cultură (realizată de la o singură colonie, crescută 36 h la  $37^\circ\text{C}$ ). Bacteria a fost recoltată după încă 36 h la  $37^\circ\text{C}$ .

*Thermus aquaticus* (extract de drojdie triptonat) a fost cultivat în microfermentator New Brunswick în mediu Castenholtz TYE (manual Bergey). Mediul s-a preparat prin amestecarea a 100 ml TYE 1% steril, 1 ml soluție „Nitsche trace element”, 50 ml săruri Castenholtz A, 30 ml săruri Castenholtz B și 800 ml apă distilată. Soluția TYE 1% conține 10 g triptonă și 10 g extract de drojdie la 1 l apă distilată. Soluția „Nitsche trace element” conține: 0,5 ml  $H_2SO_4$ , 2,2 g  $MnSO_4$ , 0,5 g  $ZnSO_4$ , 0,5 g  $H_3BO_3$ , 0,016 g  $CuSO_4$ , 0,025 g  $Na_2MoO_4$ , 0,046 g  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ /l. Sărurile Castenholtz A conțin: 2,0 g acid nitriloacetic, 20 ml din  $FeCl_3$  0,03%, 1,2 g  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ , 2,1 g  $KNO_3$ /l, iar sărurile Castenholtz B: 2,0 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,16 g  $NaCl$ , 14,0 g  $NaNO_2$ , 2,2 g  $Na_2HPO_4$ /l. Temperatura optimă de creștere pentru *Thermus aquaticus* este 70°C, dar microfermentatorul nu a permis decât 63°C. 1 l de mediu s-au inoculat cu 1 l de cultură obținută prin incubare peste noapte la 70°C; creșterea s-a făcut 6 ore la 63°C.

Celelalte tulpini bacteriene au fost cultivate într-un fermentator de creștere intensă (Lab-line Instruments) la faza log tardivă, în mediu SLBH (11 g triptonă, 22,5 g extract de drojdie, 51 ml  $K_2HPO_4$  1 M și 15,7 ml  $KH_2PO_4$  1 m la litru + 0,4% glicerol).

#### b) Activități enzimatică (testare).

Enzimele s-au testat prin electroforeza DNA hidrolizat, în agaroză 1% în tampon Tris-borat (10,8 g Tris bază, 0,93 g EDTA  $\cdot Na_2$  și 5,5 g  $H_3BO_3$ /l), timp de 1 1/4 ore la 16 v/cm.

Ca substrat se poate utiliza orice DNA cu un număr convenabil de situsuri de rupere. În general s-a folosit DNA plasmidic din *pBR322*, cu excepțiile prevăzute în tabelul 20. Pentru testarea Eco RI, DNA s-a preparat din *E. coli* tulpina GM 31 (defectivă în DNA citozinmetilază = dem). Tamponul folosit pentru testarea diverselor enzime este dat în tabelul 21. Din cauza interferenței cu alte nucleaze, unele enzime nu au putut fi testate decât după faza de cromatografie pe fosfoceluloză (tabelul 20). Pentru toate — exceptând — Eco RI — 0,5–2  $\mu$ l din extract sau din eluatul de pe fosfoceluloză s-a incubat în 30  $\mu$ l conținând 0,2  $\mu$ g DNA la 37°C (60°C pentru Tag) timp de 15–60 min. Eco RI este codificat în mai multe copii, de aceea necesită un volum mai mic de probă. Extractele brute și eluate de pe fosfoceluloză au fost diluate de cca 20 ori. Cantitățile de enzimă și timpii din tabelul 20 trebuie privite ca ghid orientativ.

#### c) Prepararea extractelor celulare.

Metoda de purificare este standardizată pentru 50 g celule. Sedimentele celulare bacteriene înghețate s-au decongelat și s-au suspendat în 200 ml tampon  $K_2HPO_4$  10 mM —  $KH_2PO_4$  pH = 7,0 cu  $\beta$ -mercaptoetanol 7 mM și EDTA 1 mM (EB=tampon de extracție), conținând și fenilmetilsulfonilfluorură (PMSF) 25  $\mu$ g/ml,  $NaN_3$  1 mM și NaCl 0,4 M. Unele enzime s-au extras cu succes și în absența azidei și a inhibitorului proteolitic (PMSF), dar adăugarea lor este de dorit.

Suspensia celulară a fost sonicată cu un ultrasonicator Branson W-350 la turația maximă și folosind o tijă de 1 inch (2,4 cm). Ultrasonicarea s-a făcut în pulsuri de 30''–90'', suspensia celulară fiind agitată pe gheață; temperatura s-a păstrat sub 10°C. Cîteva dintre tulpinile bacteriene sînt rezistente la sonicare. Acestea s-au agitat pe gheață cu adăugare de 100  $\mu$ g/ml lizozim cu 15–30 min înainte de ultrasonicare (tabel 20). Gradul de spargere a celulelor s-a urmărit prin creșterea absorbției la 280 nm a unor alicote centrifugate din extract. În cazul Eco RI, eliberarea activității enzimatică are loc în paralel cu eliberarea materialului care absoarbe la 280 nm.

Suspensia celulară ultrasonicată s-a centrifugat 1 oră la 100 000 g (rotor Beckman 35). Supernatantul s-a decantat, conductibilitatea extractului s-a diluat la un echivalent de 0,2 M NaCl sau 0,1 M NaCl, în funcție de tulpină (tabelul 21), iar pH-ul s-a ajustat la 7,0. Extractul s-a aplicat direct pe coloana de fosfoceluloză.

#### d) Cromatografia pe fosfoceluloză.

Prepararea cu grijă a fosfocelulozei este esențială pentru succesul acestei metode de purificare. 125 g de fosfoceluloză Whatman P-11 s-au suspendat în 4 l de HCl 0,2 M diluat cu alcool etilic 95% și s-au amestecat cu grijă 30 min la temperatura camerei. Suspensia a fost lăsată să se liniștească, iar supernatantul s-a aspirat sau s-a decantat pentru îndepărtarea particulelor prea fine. Rășina s-a filtrat la vid și s-a spălat de 2–3 ori prin suspendare în 4 l apă distilată. pH-ul s-a ajustat la 7 cu NaOH 1 M, rășina s-a

Tabelul 21

Testarea activității endonucleazelor restrictive eluate de pe fosfoceluloză

Enzima	Sonicare		Timp total	Testare				
	Lizozim			Tampon <sup>a)</sup>	Centri rupe- re în sub- strat <sup>b)</sup>	Ex- tract brut <sup>c)</sup>	Eluat de pe fosfoceluloză	Timp
Alu I	100 µg/ml	30'	4'	666	10	—	2 µl	30'
Bam I	100 µg/ml	30'	12'	TM	1	—	—	—
Bgl I	100 µg/ml	15'	3'	666	1	—	2 µl	60'
Bgl II	100 µg/ml	15'	3'	666	λ DNA 5	—	—	—
Eco RI	—	—	4'	TM	1	0,05µl	0,05 µl	10'
				+ 0,1 M NaCl				
Eco RII	—	—	4'	TM	5	2 µl	2 µl	30'
Hae II	—	—	4'	666	2	—	1 µl	30'
Hae III	—	—	4'	666	pMB8 > 12	—	1 µl	30'
Hga	—	—	4'	666	pKB252 5	8 µl	4 µl	20'
Hinc II	—	—	4'	666	2	—	—	—
				+ 0,05 M NaCl				
Hpa I	—	—	4'	666	pMB9 > 10	—	2 µl	15'
				+ 0,05 M NaCl				
Hpa II	—	—	4'	666	pMB9 > 10	—	2 µl	15'
				+ 0,05 M NaCl				
Hsu	—	—	4'	666	1	—	1 µl	15'
				+ 0,05 M NaCl				
Pst	100 µg/ml	15'	2'	TM	1	—	2 µl	30'
Sal I	—	—	5'	666	1	—	1 µl	60'
				+ 0,15 M NaCl				
Taq	—	—	5'	666	pBR345 1	—	—	—

a) TM = Tris 0,1 M—HCl pH = 7,5 cu MgCl<sub>2</sub> 5 mM;666 = Tris 6 mM—HCl pH = 7,5 cu MgCl<sub>2</sub> 6 mM, β-mercaptoetanol 6 mM

b) substrat DNA pBR322, cu excepțiile specifice

c) ajustarea mai exactă a cantității de extract, precum și a timpului de incubare ar putea face vizibil aspectul enzimatic al acestor endonucleaze specifice.



suspendat în 4 l NaOH 0,1 M, s-a amestecat 30 min la temperatura camerei, s-a colectat prin filtrare și s-a resuspendat în 4 l de EDTA 1 mM. S-a agitat din nou timp de 30 min la temperatura camerei și s-a spălat de 3 ori cu apă distilată. pH-ul s-a reajustat la 7 cu HCl 1 M, iar apoi rășina s-a suspendat în tampon EB cu NaCl 0,2 M. (pH-ul s-a reajustat înainte de trecerea în coloană, deoarece este mai simplu în acest mod; în coloană ar fi necesare numeroase volume de tampon pentru echilibrare). 125 g de fosfoceluloză pudră dau o umplutură de cca 500 ml. Dacă rășina inițială este impură (loturile de fosfoceluloză variază mult între ele), volumul sau numărul spălărilor cu HCl alcool etilic și NaOH va fi mărit. Particulele fine se vor îndepărta lăsând rășina să se așeze prin aspirare sau decantare. Agitarea rășinii se va face ușor, pentru a nu produce apariția de particule fine; rășina nu va fi lăsată mai mult de două ore la valorile extreme de pH.

O coloană de 150–200 ml (2,5–35 cm) este suficientă pentru 50 g celule. Înainte de împachetare se va spăla cu câteva volume de EB cu NaCl (tabelul 21). Extractul se încarcă direct în coloană, iar coloana se spală cu câteva volume de EB cu NaCl pînă cînd  $E_{280}$  scade aproape de 0. Coloana se eluează cu un gradient liniar de NaCl în tamponul de extracție (1–1,5 l; ~ 7 ori volumul coloanei). Concentrațiile individuale de NaCl pentru eluția enzimei sînt date în tabelul 21. S-au colectat fracțiuni de cîte 10 ml, care s-au testat din punct de vedere al activității endonucleazice. Fracțiunile corespunzătoare picului de activitate s-au reunit și s-au supus cromatografiei pe hidroxiapatită.

e) *Cromatografia pe hidroxiapatită.*

S-a împachetat o coloană de 20 ml de hidroxiapatită (Clason chemical Co.) și s-a echilibrat cu EB cu NaCl 0,2 M. Fracțiunile active reunite de pe fosfoceluloză s-au aplicat direct pe coloană, iar coloana s-a spălat cu cca 100 ml de EB cu EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 7 mM,  $\text{NaN}_3$  1 mM și NaCl 0,2 pH = 7. Tabelul 22 prezintă concen-

Tabelul 22

Concentrațiile saline de eluție cromatografică a endonucleazelor restrictive

Enzima	Cromatografie pe fosfoceluloză			Cromatografie pe hidroxiapatită			Randament 50g unit <sup>b)</sup> /celule	Utilizată pentru determinarea de secvențe
	Molaritate	NaCl	Molaritate	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	50g unit <sup>b)</sup> /celule		
	Încăr- care co- loană	Gradient	Eluție enzimă	Gradient	Eluție enzimă <sup>a)</sup>			
Alu I	0,2	0,2–1,0	0,35	0,01–0,25	0,10	4 000	—	
Bam I	0,2	0,2–0,6	0,35	0,01–0,25	0,08	60 000	—	
Bgl I	0,2	0,2–0,8	0,30	0,01–0,50	0,30	—	NT <sup>c)</sup>	
Bgl II	0,2	0,2–0,8	0,50	0,01–0,40	0,27	—	NT	
Eco RI	0,2	0,2–0,8	0,60	0,01–0,50	0,20	1 000 000	—	
Eco RII	0,2	0,2–0,6	0,40	0,01–0,25	0,04	15 000	—	
Hae II	0,2	0,2–1,0	0,40	0,01–0,50	0,25	60 000	—	
Hae III			0,90	0,01–0,50	0,25	180 000	—	
Hga	0,2	0,2–1,0	0,40	—	—	6 000	NT	
Hinc III	0,1	0,1–0,6	0,35	0,01–0,25	0,06	—	NT	
Hpa I	0,2	0,2–1,0	0,45	0,01–0,50	0,30	500	NT	
Hpa II	0,2	0,2–1,0	0,30	0,01–0,50	0,20	25 000	NT	
Hsu I	0,2	0,2–0,0	0,30	0,01–0,25	—	60 000	—	
Pst I	0,2	0,2–0,6	0,35	0,01–0,40	0,20	30 000	NT	
Sal I	0,2	0,2–0,8	0,40	—	—	25 000	NT	
Taq	0,2	0,2–0,8	0,40	0,01–0,25	0,12	8 000	—	

<sup>a)</sup> Concentrații de eluție aproximative.

<sup>b)</sup> Unitate — cantitatea de enzimă necesară pentru a hidroliza complet 1  $\mu\text{g}$  DNA în decurs de o oră la 37°C (sau 60°C pentru Taq). Cantități minime estimate.

<sup>c)</sup> NT — netestat.

trațiile de fosfat de potasiu pentru fiecare enzimă în parte. S-au colectat fracțiuni de 4 ml, care s-au testat din punct de vedere enzimatic. Fracțiunile corespunzătoare picurilor s-au unificat și s-au dializat contra tamponului de păstrare ( $K_2HPO_4 \cdot KH_2PO_4$  20 mM, pH = 7, NaCl 0,2 M, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 7 mM,  $NaN_3$  1 mM diluat 1:1 cu glicerol). Această dializă concentrează enzima de cca 3 ori. În acest tampon enzimele sînt stabile mai multe luni la  $-20^\circ C$ . Preparate enzimatice mult mai concentrate se obțin prin dializa fracțiunilor de pe hidroxiapatită contra PEG-6000 solid, anterior dializei contra tamponului de păstrare.

Trei enzime — Sal I, EcoRII, Hga I — nu se leagă bine la hidroxiapatită: cca 70% din EcoRI, 90% din Hga I și tot Sal I (ca activitate) se regăsesc în lichidele care curg prin coloană. În cazul EcoRII și Sal I se leagă de coloană cea mai mare parte a activităților contaminante, ceea ce constituie totuși un grad de purificare.

#### f) Cromatografia pe Biorex 70.

După cromatografia pe fosfoceluloză și hidroxiapatită, Hga I conține în continuare o mare cantitate de contaminanți (exonucleaze). Ceea ce a curs de pe coloana de hidroxiapatită s-a concentrat, dializat contra EB și s-a purificat în continuare prin cromatografie pe Biorex 70 (Biorad).

Coloana cu o umplutură de 20 ml s-a echilibrat cu EB, iar fracțiunea purificată de pe hidroxiapatită se aplică integral. Coloana s-a spălat cu EB și s-a dezvoltat cu un gradient de 0—0,5 M NaCl în EB. Cea mai mare parte a exonucleazei a fost prezentă în ceea ce a curs, în timp ce Hga eluează la cca 0,3 M NaCl. Cromatografiei pe Biorex i s-a supus și EcoRII și Hpa II. Ca și în cazul Hga, exonucleazele au apărut în „void-volum”, iar endonucleazele de restricție au eluat la 0,3—0,4 M NaCl.

Cromatografia pe Biorex 70 se poate aplica tuturor restrictazelor.

#### g) Discuție.

Procedeul prezentat constituie simplificarea unui procedeu publicat anterior pentru EcoRI. Toate enzimele se leagă la fosfoceluloză la concentrații de NaCl suficient de mari pentru a disocia enzima de DNA în extractele brute. Aceasta permite adăugarea directă a extractului brut pe fosfoceluloză; acizii nucleici nu se leagă la coloană și se spală. Streptomicina și  $(NH_4)_2SO_4$  ca agenți precipitanți sînt evitați, iar etapele de dializă reduse, ceea ce are ca urmare scurtarea procedurii de purificare și un randament crescut de extracție.

Digestia DNA duce la apariția unor fragmente clare în gel; acestea pot servi ca substrat pentru DNA-ligază, ceea ce duce la reformarea situsurilor de rupere.

### Metoda de purificare și testare a ligazei T4 necesară construirii de molecule de DNA recombinant (după Moore și James, 1976)

Principiul metodei se bazează pe faptul că cea mai mare parte a activității exonucleazice din extractele brute de *E. coli* B eluează de pe fosfoceluloză la concentrații saline mici (0,25 M KCl), în timp ce ligaza eluează în domeniul 0,30—0,36 M KCl; aceasta permite testarea activității ligazice de la bun început.

### Materiale și metode

Bacterii: *E. coli* RY-13 (*E. coli* B avînd factorul 1 de transfer al rezistenței la antibiotice); *E. coli* JC411thy<sup>-</sup> (Col E<sub>1</sub>) pentru factorul colicin E<sub>1</sub>; *E. coli* lizogen  $\lambda$ cl857sus S7.

Enzime: EcoRI preparată prin cromatografie pe fosfoceluloză, hidroxiapatită, DEAE-celuloză.

Bacteriofagul T4 se crește după metoda descrisă de Thomas și Abelson (1966). Celulele sînt cultivate și infectate după metoda preconizată de Weiss și colab. (1967).



Cultura bacteriană se recoltează prin trecerea ei rapidă prin serpentine de oțel inoxidabil răcite în baie de gheață, urmată de centrifugarea 7 min la 6 000 xg. Celulele se păstrează la  $-70^{\circ}\text{C}$ . Toate operațiile următoare au loc la  $4^{\circ}\text{C}$  și toate tamponurile conțin  $\beta$ -mercaptoetanol 7 mM (dacă nu se dau alte indicații).

Celulele înghețate (65 g) se suspendă în 450 ml tampon A (Tris 10 mM — HCl pH 7,6 cu glutation 1 mM în loc de  $\beta$ -mercaptoetanol) și se sparg prin ultrasonicare 10 min (20 de șocuri a 30 s) cu ultrasonicator Branson model W 185 la puterea maximă. Resturile celulare se îndepărtează prin ultracentrifugare 60 min la 100 000xg. Acizii nucleici înalt polimerizați se îndepărtează prin precipitare cu sulfat de streptomycină. Pentru completarea precipitării acizilor nucleici, supernatantul obținut prin centrifugarea preparatului anterior, se tratează din nou cu sulfat de streptomycină. Apoi se adaugă  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solid până la saturare 50%, cu agitare 30 min. După centrifugare la 15 000xg timp de 20 min, sedimentul rezultat se dizolvă în 100 ml tampon A și se dializează 18 ore contra  $3 \times 1$  l tampon fosfat potasic 0,010 M cu KCl 0,1 M pH 7,6 (tampon B). Noul preparat se aplică pe o coloană de fosfoceluloză Whatman P-11  $2,5 \times 50$  cm, echilibrată cu tampon B. Coloana se spală cu 1 l tampon B, iar apoi se aplică un gradient liniar (volum total = 2 l) de 0,1 — 0,8 M KCl în tampon fosfat potasic 0,010 M pH 7,6. Frațiunile active (1000 unit/ml) și care eluează în zona 0,3—0,36 M KCl se unifică, se dializează 18 ore contra  $3 \times 2$  l tampon Tris 0,15 M—HCl pH 7,6 cu KCl 0,05 M (tampon C). Preparatul se aplică pe o coloană de DEAE-celuloză Whatman DE-52  $2,5 \times 50$  cm, echilibrată cu tampon C, se spală cu 1 l tampon C și se eluează cu un gradient liniar (volum total = 2 l) de 0,05—0,30 M KCl în tampon Tris 0,015 M—HCl pH 7,6. Frațiunea activă — 0,12—0,15 M KCl — se concentrează prin dializă contra tamponului C cu 50% glicerol și se păstrează la  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Prepararea DNA substrat

Fragmentele de DNA obținute în urma hidrolizei DNA cu Eco RI se extrag odată cu fenol saturat cu EDTA  $\cdot \text{Na}_2$  10 mM pH 8,0 și se dializează exhaustiv contra tampon Tris 10 mM—HCl pH 7,6. Pentru a produce legarea fragmentelor 1 și 6 de DNA prin mijlocirea punților de hidrogen dintre capetele coezive ale acestora, alicote din hidrolizat se aduc la  $\text{MgCl}_2$  10 mM, se incubează la  $50^{\circ}\text{C}$  timp de 3 ore și se lasă să se răcească încet. Prezența  $\text{Mg}^{2+}$  permite formarea rapidă a legăturilor de hidrogen la capetele coezive, fără a mai reclama concentrații ridicate de  $\text{Na}^+$ .

### Testarea activității ligazice

Se urmărește conversia legăturii de hidrogen dintre fragmentele 1 și 6 ale hidrolizatului de DNA cu Eco RI la o legătură covalentă (tip CCI), cu formare de DNA nedaturabil termic. Amestecul de reacție standard conține într-un volum de 25  $\mu\text{l}$ : 2,5  $\mu\text{g}$  fragmente de DNA  $\lambda$ , Tris 50 mM—HCl pH 7,6, DTT 10 mM, ATP 0,07 mM și cantități variabile de enzimă, diluată în tampon Tris 50 mM—HCl pH 7,6 cu 500  $\mu\text{g/ml}$  albumină bovină. Amestecul se incubează 30 min la  $37^{\circ}\text{C}$ . Reacția se stopează prin adăugare de EDTA  $\text{Na}_2$  5 mM pH 8,0. Amestecul se încălzește 10 min la  $65^{\circ}\text{C}$ , iar apoi se răcește brusc la  $0^{\circ}\text{C}$  pentru a desface toate legăturile, în afara celor covalente. Se adaugă sucroză și albastru de bromfenol în concentrații de 10% și, respectiv 0,02% (g/v). Probele astfel pregătite se supun electroforezei pe geluri de agaroză de 10 cm lungime și 0,8% concentrație. În acest caz, unitatea de activitate enzimatică o reprezintă acea cantitate de ligază care leagă covalent capetele coezive dintr-un 1  $\mu\text{g}$  de DNA ( $3,9 \times 10^{10}$  capete) în condiții standard. Aceasta corespunde cu dispariția benzii 6 din gel.



## Transformarea celulelor de *E. coli* K12 cu DNA plasmidic (după Berg și colab., 1976)

Pentru transformarea celulelor de *E. coli* cu DNA plasmidic, autorii au adaptat astfel procedeu clasic al lui Mandel și Higa (1970):

Celulele bacteriene competente se cresc la 37°C în mediu L până când densitatea mediului atinge valoarea  $E_{600} = 0,3-0,6$ . Cultura se răcește la 0°C pe baie de gheață, iar celulele se sedimentează și se resuspendă la rece în 0,5 volume de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M. Se centrifughează din nou, iar sedimentul se resuspendă în 0,1 volume  $\text{CaCl}_2$  0,1 M. Apoi, probele de 0,1 ml DNA plasmidic reluat în tampon TEN (Tris 0,02 M; EDTA 0,001 M; NaCl 0,02 M; pH 8,0), răcite la 0°C se adaugă la 0,2 ml celule competente răcite pe baie de gheață. În scopul creșterii frecvenței de transformare, probele s-au încălzit 30 s. la 37°C, imediat după amestecare.

De menționat că, pentru a facilita captarea DNA plasmidic în celulele competente, alți autori, de exemplu Lederberg și Cohen (1974) recomandă ca amestecul de reacție să fie incubat inițial 30 min la 0°C și apoi să se încălzească 2 min la 42°C.

După transformare, celulele tratate se incubează la 37°C timp de 60–90 min, în mediu cu 10% glicerol și antibioticul adecvat (tetraciclină 2  $\mu\text{g/ml}$ , în cazul special al plasmidei studiate de autori). Apoi se face clonarea pe plăci cu agar nutritiv și antibiotic, de exemplu tetraciclină 25  $\mu\text{g/ml}$ .

## Metoda generală de construire a unor DNA recombinanți (după Clarke și Carbon, 1975)

Plasmidele hibride au fost construite *in vitro* folosind pentru legare poli(dA · dT) prin metoda descrisă de Lobban și Kaiser (1973) și Jackson și colab. (1972).

Endonucleaza restrictivă Eco RI, exonucleaza  $\lambda$ , deoxinucleotidiltransferaza terminală din timusul de vițel se prepară conform metodelor specifice.

Col  $E_1$  CCI DNA sau DNA de *E. coli* se hidrolizează total cu enzima restrictivă Eco RI într-un amestec de reacție care conține Tris 10 mM – HCl pH 7,5 cu NaCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, gelatină 100  $\mu\text{g/ml}$  și DNA 100  $\mu\text{g/ml}$ . Reacția durează 30 min la 37°C, apoi amestecul se răcește brusc la 0°C pe baie de gheață. Amestecului de reacție i se adaugă o jumătate de volum de soluție glicină 200 mM-KOH pH 9,4 cu  $\text{MgCl}_2$  12 mM, conținând 400 unități de exonuclează  $\lambda/\text{ml}$  și se lasă încă 30 min pe gheață. Pentru stoparea reacției se adaugă EDTA Na 10 mM, după care DNA se extrage cu fenol și se precipită cu alcool etilic. Anterior s-a determinat că tratamentul cu exonuclează  $\lambda$  îndepărtează cca 25 nucleotide de la capătul 5'-fosfat al DNA. Acest tratament înlesnește reacția următoare, a transferazei terminale.

La capetele 3'-hidroxil se adaugă extensii poli(dA) și poli(dT) în modul descris anterior. Extensiile poli(dT) se leagă la DNA Col  $E_1$ ; amestecul de reacție conține ca-codilat de potasiu 100 mM pH 7,0,  $\text{MgCl}_2$  8 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7,5 mM,  $\text{CoCl}_2$  0,5 mM, BSA 150  $\mu\text{g/ml}$ , [ $^3\text{H}$ ] dTTP 0,1 mM, DNA 100  $\mu\text{g/ml}$  și transferază terminală 55  $\mu\text{g/ml}$ . Amestecul de reacție se incubează 25 min la 37°C și se stopează prin adăugare de EDTA · Na 10 mM. DNA Col  $E_1$  cu extensie politimidilată se extrage cu fenol și se precipită cu alcool etilic. În condițiile prezentate per moleculă de DNA se atașează aproximativ 300 rezidii dT sau 150 rezidii dT per catenă. Extensiile poli(dA) se atașează la DNA *E. coli*, într-un amestec de reacție similar cu anterior, dar din care se omite  $\text{CoCl}_2$  și folosind [ $^3\text{H}$ ] dATP 0,1 mM, DNA *E. coli* 100  $\mu\text{g/ml}$ , transferază terminală 180  $\mu\text{g/ml}$ . Reacția durează 45 min la 37°C și se stopează prin adăugare de EDTA · Na 10 mM. DNA *E. coli* cu extensie poliadenilică se extrage cu fenol și se precipită cu alcool etilic. Per moleculă de DNA se introduc astfel aproximativ 300 resturi dA sau 150 rezidii dA per catenă, considerând că genomul de *E. coli* ( $2,7 \times 10^6 \text{D}$ ) este tăiat în aproximativ 400 fragmente de Eco RI (masa moleculară a fragmentelor aproximativ  $6,3 \times 10^6 \text{D}$ ).



Se amestecă cantități egale de DNA *Col E*<sub>1</sub>-(dT)<sub>150</sub> și DNA *E. coli*-(dA)<sub>150</sub> (5 μg/ml) în tampon Tris 10 mM-HCl pH 8,0 cu NaCl 100 mM, EDTA-Na 1 mM și se lasă să se „ordoneze” timp de 1 oră la 46°C, 1 oră la 37°C, 1 oră la 23°C sau 16 ore la 37°C. Preparatoarele ordonate de DNA se concentrează prin precipitare cu alcool etilic și se păstrează la 4°C în tampon Tris 10 mM-HCl pH 8,0 cu NaCl 10 mM, EDTA-Na 1 mM.

Un avantaj al metodei cu „conectori” poli(dA · dT) este acela că evită folosirea ligazei pentru obținerea DNA circular. Preparatoarele de DNA nelegate sînt infectante și sînt convertite la formă CCI DNA *in vivo*.

## Metoda de construire a unui DNA recombinant conținînd gena pentru sinteza somatostatinei după Itakura și colab. (1977)

Ca plasmidă parentală se folosește plasmida *pBR322*. 5 μg DNA plasmidic se hidrolizează cu Eco RI. Reacția se stopează prin extracție cu un amestec de fenol și cloroform, iar DNA se precipită cu alcool etilic și, apoi se reia în 50 μl de tampon pentru DNA polimeraza T4. Reacția se inițiază prin adăugarea a 2 unități de DNA polimerază T4 și decurge timp de 30 min la 37°C. Stoparea reacției se face și de această dată prin extracție cu fenol și cloroform, urmată de precipitarea cu etanol. 3 μg DNA *plac5* se hidrolizează cu Hae III. Printr-o reacție ligazică între fragmente cu capete netede, se face unirea DNA *pBR322* hidrolizat ca mai sus cu DNA *plac5*; reacția a decurs într-un volum de 30 μl, folosind T4 ligază eluată de pe hidroxiapatită, în tampon Tris 20 mM-HCl pH 7,6 cu MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 10 mM și ATP 0,5 mM, timp de 12 ore la 12°C. Amestecul de DNA „legat” se dializează contra tamponului Tris 10 mM-HCl pH 7,6 și se folosește pentru transformarea tulpinii bacteriene *E. coli RR*<sub>1</sub>. Transformanții se selectează din punct de vedere al rezistenței la tetraciclină și ampicilină (Tc<sup>r</sup> și Ap<sup>r</sup>), pe mediu minimal *X-gal* (40 μg/ml) cu antibiotice (20 μg/ml).

Coloniile care sintetizează β-galactozidază se identifică prin culoarea lor albastru deschis. Se face un screening pe 45 de colonii albastru deschis; cele 3 colonii care conțin plasmide caracterizate prin prezența a două situsuri de recunoaștere pentru Eco RI, separate prin aproximativ 200 perechi de nucleotide. Plasmida *pBH10* se dovedește că este purtătoarea unui fragment integrat de DNA, într-o poziție convenabilă, adică operatorul *lac* se află tangent cu gena Tc<sup>r</sup> a plasmidei. În continuare, plasmida *pBH10* se modifică în vederea eliminării situsului de recunoaștere pentru Eco RI, care se află în poziție distală față de operatorul *lac*. În acest mod se realizează plasmida *pBH20*, care se utilizează pentru clonarea genei sintetice a somatostatinei.

10 μg DNA plasmidic *pBH20* se hidrolizează cu Eco RI și Bam HI și apoi se tratează cu 0,1 unități fosfatază alcalină bacteriană (Worthington), timp de 10 min la 65°C. Amestecurile de reacție se extrag cu fenol și cloroform, iar DNA se precipită cu etanol. 50 μl de soluție, cu 4 μg DNA specific pentru somatostatină per ml, se introduc în reacție ligazică împreună cu DNA *pBH20* (tratată în modul descris, în prezența a 4 unități DNA-ligază T4, timp de 2 ore la 22°C). Într-un experiment martor, făcut în paralel, *pBH20* tratată ca mai sus se introduce în reacție ligazică, în absența DNA specific pentru somatostatină. Ambele preparate, rezultate din reacția ligazică, se folosesc în continuare pentru transformarea celulelor *E. coli RR*<sub>1</sub>. Transformanții se selectează pe plăci cu antibiotice și mediu *X-gal* minimal. Din cei 10 transformanți Tc<sup>r</sup> (în experimentul martor nu se obțin nici un fel de transformanți), 4 se dovedesc a conține plasmide cu centri de recunoaștere pentru Eco RI și Bam HI. Mărimea fragmentului mic de DNA, cuprins între cele două situsuri de recunoaștere pentru restricțaze, este — în fiecare din cele 4 cazuri analizate — similară cu mărimea DNA specific pentru somatostatină, preparat *in vitro*. Analiza secvenței bazelor arată că noua plasmidă obținută *pSOMI* conține inserat DNA specific pentru somatostatină. Deoarece nu s-a reușit detectarea activității hormonale a somatostatinei din culturile bacteriene cu plasmidă *pSOMI*, s-a construit o nouă plasmidă, în care gena pentru somatostatină este localizată a capătul —COOH al genei pentru β-galactozidază. În acest scop, 50 μg DNA *pSOMI*



se hidrolizează cu Eco RI și Pst I. Pentru izolarea celui mai mare fragment Eco RI — Pst I, care poartă gena pentru somatostatină, de fragmentul mic de DNA, care poartă controlul *lac*, se folosește un gel preparativ de poliacrilamidă (5%). În același mod s-a procedat și pentru plasmida *pBR322*: 50  $\mu$ g DNA se hidrolizează cu Eco RI și Pst I, iar fragmentul cel mai mic de *pBR322* rezultat se purifică electroforetic. 1  $\mu$ g din acest fragment mic intră în reacție ligazică cu 5  $\mu$ g din fragmentul mare de *pSOMI*. DNA „legat” obținut se folosește pentru transformarea *E. coli RR<sub>1</sub>*. Transformanții au fost selecționați pentru rezistența la ampicilină ( $Ap^r$ ) pe mediu *X-gal*. Aproximativ 95% din transformanți dau colonii albe pe plăci cu indicator *X-gal*, arătând lipsa operatorului *lac*. Plasmida rezultată — *pSOMII* — se folosește pentru construirea plasmidei *pSOMIII*. 5  $\mu$ g DNA *pSOMII* și 5  $\mu$ g *plac* DNA se hidrolizează cu Eco RI. DNA se extrage cu fenol și cu cloroform, iar DNA se precipită cu etanol. Precipitatul rezultat se resuspendă în 50  $\mu$ l tampon pentru T4 DNA ligază, la care se adaugă 1 unitate de ligază. Noul DNA, obținut în urma reacției ligazice, se folosește pentru transformarea celulelor de *E. coli RR<sub>1</sub>*. Transformanții se selectează pentru rezistența la ampicilină ( $Ap^r$ ) pe plăci cu indicator *X-gal* cu ampicilină, iar apoi se face screening-ul pentru detectarea producției genei  $\beta$ -galactozidazei inserate. Aproximativ 2% din colonii sînt albastre deschise (ca și pentru *pSOMI* și *pSOMI-2*). Analiza cu endonucleaze restrictive a DNA plasmidic obținut din aceste clone a arătat că toate plasmidele conțin un nou fragment Eco RI de aproximativ 4,4 Mdal, care poartă genele pentru operatorul *lac* și cea mai mare parte a genei pentru  $\beta$ -galactozidază. Fragmentul Eco RI poate avea două orientări, iar localizarea simetrică a activității restrictive Hind III pe acest fragment ar putea arăta plasmida în care se realizează gena de interes, anume a genei pentru somatostatină.

### Bibliografie

1. Bazaral, M., Helinski, D.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 185 (1968).
2. Berg, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 697 (1976).
3. Colman, A., Byers, M., Primrosi, S.B., Lyons, A., *Eur. J. Biochem.*, **91**, 303 (1978).
4. Clarke, L., Carbon, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **72**, 4361 (1975).
5. Clewell, D.B., Helinski, D.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **62**, 1159 (1969).
6. Eckhardt, T., *Plasmid*, **1**, 584 (1978).
7. Greene, P.J., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russel, D., Tait, R., Boyer, H.W., *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2373 (1978).
8. Guerry, P., LeBlanc, D.J., Falkow, S., *J. Bacteriol.*, **116**, 1064 (1973).
9. Horiuchi, T., Ohshima, Y., *J. Mol. Biol.*, **20**, 512 (1966).
10. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
11. Moore, S.K., James, E., *Anal. Biochem.*, **75**, 545 (1976).
12. Popa, L.M., Repanovici, R., Iliescu, R., Anghelescu, S., *Rev. Roum. Biochim.*, **4**, 279 (1980).
13. Sol, C.J.A., Walig, C., Schegget, Ter, J., van der Noordaa, J.S., *J. Gen. Virol.*, **28**, 285 (1975).
14. Yoshimori, R.N., Teză de doctorat, Universitatea California (1973).

Redactor: ing. CARMEN ZGĂVÂRDICI

Tehnoredactor: MARILENA DAMASCHINOPOL

Coli de tipar: 19,30. Bun de tipar: 23.02.1982.



Tiparul executat sub comanda  
nr. 669 la  
Întreprinderea poligrafică  
„13 Decembrie 1918”,  
str. Grigore Alexandrescu nr. 89-97  
București,  
Republica Socialistă România



Lei 22

EDITURA  
ȘTIINȚIFICĂ ȘI  
ENCICLOPEDICĂ

